

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN**

**Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia**



**Caracterización biofísica y funcional de nuevas especies  
oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína inducidas por fármacos: implicancia  
en la Enfermedad de Parkinson**

**Lic. María Florencia González Lizarraga**

**-2019-**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



## HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos  
Dr. Manuel Javier Aybar  
Dra. Viviana Andrea Rapisarda  
Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano  
Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra  
Dra. María Antonieta Gordillo  
Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga  
Sr. Mario Rodríguez  
Sr. Joaquín Hernán Vargas  
Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez  
Srta. Karen Nahir Ríos

### DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

### VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

## SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

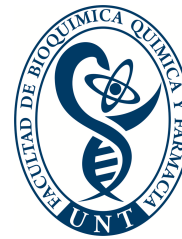
Dra. Marta Elena Cecilia

## JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Inés Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



## DEPARTAMENTO DE POSGRADO

### AUTORIDADES:

#### DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

#### CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos  
Dra. María Carolina Navarro  
Dra. María Cristina Gaudioso  
Dra. Paula Andrea Vincent  
Dra. Maria Cristina Rubio

#### Suplentes

Dra. María Graciela Benzal  
Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz  
Dra. María Inés Nieva Moreno  
Dra. Claudia Alejandra Crespo  
Dra. María Angélica Véliz

### REPRESENTANTE DE POSGRADO ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



# TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

## CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución n°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la  
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)  
Resolución n°: Resolución 750- CONEAU -13

### **Director:**

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

### **Vice-Directora:**

Dra. Lucía Claps

### **Comité Académico:**

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Silvina Fadda





UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN - San Miguel de Tucumán - República Argentina



## TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**“Caracterización biofísica y funcional de nuevas especies  
oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína inducidas por fármacos: implicancia  
en la Enfermedad de Parkinson”**

TESISTA:

Lic. María Florencia González Lizarraga

DIRECTOR/A:

Dra. Rosana Chehín

CODIRECTOR/A

Dra. Lía Isabel Pietrasanta

COMISION DE SUPERVISION :

Dra. María Soledad Celej

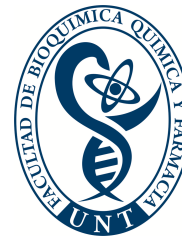
Dr. Fernando Dupuy

Dra. Rosana Chehín

Dra. Lía Isabel Pietrasanta



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA  
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169  
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



Este trabajo de Tesis Doctoral se desarrolló en:



**Instituto de Investigación en Medicina Molecular y Celular Aplicada (IMMCA) (CONICET/UNT/SIPROSA).**

También se realizó en:



**Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj” de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán e Instituto Superior de Investigaciones Biológicas – INSIBIO (CONICET/UNT).**



**Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la Facultad de Ciencias y Naturales. Universidad de Buenos Aires**



**Instituto del Cerebro y de la Médula Espinal (ICM), Paris - Francia**

Con el apoyo financiero de:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCYT)

Secretaría de Ciencia, Arte e innovación Tecnológica (SCAIT)

# *Agradecimientos*

Agradezco enormemente a todos los que me acompañaron en esta etapa de mi vida:

A mis directores: Dra. Rosana Chehín y Dra. Lía Pietrasanta, por su guía y colaboración a lo largo de estos años. Estoy infinitamente agradecida por ayudarme a finalizar este trabajo de Tesis, trabajando incansablemente día y noche.

A la Dra. Soledad Celej y Dr. Fernando Dupuy, por sus consejos en cada reunión y fuera de ellas.

A la Dra. Rita Raisman-Vozari por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por contagiar esas hermosas ganas de hacer ciencia.

Al Señor Claude Burgio por creer y apostar en nuestro proyecto.

A mis compañeros de grupo que me acompañaron a diario durante estos años: Lic. Belén Machín, Bioq. Luciana Medina, Bioq. Mónica Baleani, Lic. Sabrina Sequeira, Lic. Cecilia Vera, Dra. Silvina Chaves, Dr. Esteban Vera Pingitore, Dr. Benjamín Socías, Dr. Diego Ploper, Dr. Alejandro De Athayde Moncorvo, Dra. Eva Velez.

A todos mis compañeros del Centro de Microscopías Avanzadas (CMA): Dra. Micaela Bianchi, Dra. Lorena Sigaut, Dra. María Claudia Marchi, Dr. Silvio Ludueña, Dr. Natalio Vincenzo, Dra. Catalina von Bilderling y al Dr. Nicolas Muzzio.

A mis compañeros del ICM: Dr. Patrick Michel, Dra. Sabah Hamadat, Dr. Mauricio Pereira, Dr. Jeremy Rocca, Dra. Elaine Del Bel, Dra. Julia Sepúlveda-Díaz.

A mis colaboradores: Dra. Rosangela Itri, Dr. Leandro Barbosa, Dr. Gustavo Campos, Dr. Andrés Binolfi que sin ellos no hubiera completado este trabajo.

A todos mis compañeros de INSIBIO: Dr. Juan Carlos Díaz Ricci, Bioq. Silvia Navarra, Lic. Lucía Lanza, Dra. Milagros Chalon, Dr. Augusto Bellomio, Dr. Miguel Ulivarri, Bioq. Paula Salazar, Dra. Emilce Galván, Lic. Stefania Costas, Dr. Gustavo Martínez Zamora, Dra. Fernanda Guerrero, Dra. Nadia Chafoun, Dr. Carlos Grellet, Lic. Rodrigo Tomas Grau, Dr. Gustavo Martos, Dra. Sabrina Volentini, Lic. Mariano Koltan, Lic. Victoria Arias, Lic. Andres Lachenicht, Dra. Daiana Peralta, Dra. Gabriela Michavilla, Dra. Clarisa Maria Torres-Bogreau, Dr. Leonardo Acuña.

A mi madre y a mi hermano por su apoyo incondicional y por darme la tranquilidad que necesito en momentos difíciles.

A Cesar por siempre confiar en mí y soportarme en estos días donde paso de la risa al llanto cada dos minutos.

A mi hermana de la vida, Rita Griffó, por el apoyo en todos estos años.

A la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB) que gracias a las actividades en recursos humanos en el área de biofísica me posibilitaron entrenarme en la mayoría de las técnicas que fueron esenciales para el desarrollo de la presente Tesis.

A Marta Quinteros y Carlos Puig

A CONICET y Universidad Nacional de Tucumán

A Dios por darme la posibilidad de realizar todo lo que pude hacer y por conocer a personas maravillosas durante este camino.

*A mis Abuelos*

*A mi Madre*

*A mi Hermano*

*A mi Esposo*

# Índice

RESUMEN .....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	3
<i>I.1 Plegamiento proteico</i> .....	4
I.1.1. La agregación amiloide .....	6
I.1.2. Caracterización estructural y morfológica de los agregados amiloides .....	8
I.1.3. Plegamiento <i>in vivo</i> y proteostasis celular .....	11
<i>I.2. La Enfermedad de Parkinson: una patología relacionada a la acumulación de agregados proteicos</i> .....	13
I.2.1. Estructura, localización y fisiopatología de la proteína $\alpha$ -sinucleína .....	14
I.2.2. Propagación prionoide de la proteína $\alpha$ -sinucleína .....	17
I.2.3. Proceso de neuroinflamación: implicancias de las células gliales .....	19
<i>I.3. Tratamientos farmacológicos para la Enfermedad de Parkinson</i> .....	22
I.3.1. Nuevas estrategias terapéuticas para prevenir la Enfermedad de Parkinson .....	23
I.3.2. Acelerando el desarrollo de tratamientos farmacológicos a través del reposicionamiento de drogas .....	26
I.3.3. Tetraciclinas: una nueva opción para su reposicionamiento en el área de las enfermedades neurodegenerativas .....	27
II. OBJETIVOS .....	31
III. FUNDAMENTOS E IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES .....	34
<i>III. 1. Expresión y purificación de la proteína <math>\alpha</math>-sinucleína</i> .....	35
<i>III. 2. Espectroscopía de fluorescencia</i> .....	36
III.2.1. Estudio de los cambios conformacionales producidos durante la agregación patológica de la proteína $\alpha$ -sinucleína .....	36
III.2.2. Estudio de la exposición de nuevas superficies hidrofóbicas al disolvente .....	39
III.2.3. Estudio de la interacción de CMT-3 con la proteína $\alpha$ -sinucleína por medio de anisotropía de fluorescencia .....	40
III.2.4 Estudio de la interacción de las especies agregadas de $\alpha$ -sinucleína con membranas lipídicas .....	41

III.3. Dispersión de la luz y turbidimetría. Estudio de agregación de la proteína $\alpha$ -sinucleína.....	43
III.4. Espectroscopía vibracional. Estudio de los cambios conformacionales de $\alpha$ -sinucleína inducido por la doxiciclina y la CMT-3 mediante espectroscopía de infrarrojo .....	44
III.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Estudio de la interacción de doxiciclina con proteína $\alpha$ -sinucleína .....	45
III.6. Dispersión de Rayos-X a ángulos bajos (SAXS). Estudio de la reacción de agregación de la proteína $\alpha$ -sinucleína en presencia de doxiciclina.....	47
III.7. Microscopías Avanzadas. Análisis morfológicos de las especies agregadas de la proteína $\alpha$ -sinucleína .....	48
III.7.1 Microscopía confocal de barrido láser.....	48
III.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de Barrido (MEB) ..	50
III.7.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	52
III.8. Cultivos celulares.....	57
III.8.1. Estudio de la actividad neuroprotectora de oligómeros formados de $\alpha$ -sinucleína en presencia de la doxiciclina .....	57
III.8.2. Producción de cultivos primario de microglía. Estudio del efecto anti neuroinflamatorio de la tetraciclina CMT-3 .....	59
IV. RESULTADOS .....	61
IV.1: Estudio de las propiedades neuroprotectoras de la doxiciclina .....	63
IV.2: Búsqueda y caracterización de un análogo de doxiciclina con baja actividad antibiótica para su reposicionamiento .....	79
IV.3: Estudio del efecto de la CMT-3 en el proceso de agregación de la proteína $\alpha$ -sinucleína.....	85
IV.4: Capacidad de la CMT-3 de interaccionar y desestabilizar la estructura cuaternaria de especies fibrilares de la proteína $\alpha$ -sinucleína .....	93
V. DISCUSIÓN.....	103
VI. CONCLUSIONES.....	113
VII. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	115
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	118

# Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas son procesos crónicos, progresivos y complejos caracterizadas por la pérdida selectiva de neuronas en los sistemas motor, sensorial y cognitivo. Estas patologías, que actualmente afectan a más de 42 millones de personas en el mundo, están asociadas a la acumulación anormal de agregados amiloides de proteínas específicas en el tejido nervioso. La agregación de  $\alpha$ -sinucleína en neuronas dopaminérgicas es la evidencia histopatológica y el principio etiopatológico en la enfermedad de Parkinson (EP) donde las especies oligoméricas de esta proteína son responsables de la muerte neuronal y de la diseminación de la patología. Por otro lado, las especies fibrilares resultantes del proceso de agregación están relacionadas con el inicio y/o desarrollo del proceso neuroinflamatorio característico de la EP.

Si bien numerosas moléculas demostraron ser eficientes inhibidores de la agregación amiloide de  $\alpha$ -sinucleína *in vitro*, no han logrado proporcionar una neuroprotección efectiva *in vivo* y actualmente no existen fármacos capaces de detener y/o revertir el daño neuronal. Estas altas tasas de fracasos son debidas a la toxicidad o incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica de la mayoría de las moléculas estudiadas. En este contexto, el reposicionamiento de drogas ya existentes en la farmacopea sobre nuevos blancos terapéuticos es una estrategia que está siendo actualmente muy explorada ya que permite utilizar “*a priori*” el conocimiento disponible sobre absorción, metabolismo, biodisponibilidad y toxicidad de las moléculas a estudiar.

El presente trabajo de tesis logró demostrar en modelos biofísicos y celulares que doxiciclina, una tetraciclina de segunda generación, es capaz de interferir en la agregación patológica de  $\alpha$ -sinucleína formando especies de menor toxicidad e inhibiendo el proceso de nucleación-polimerización necesario para la propagación de la patología. La buena biodisponibilidad en cerebro de esta molécula, así como su potencial antioxidante y su baja toxicidad para tratamientos a largo plazo la convierten en un excelente modelo de reposicionamiento para la EP.

Realizamos también un detallado estudio estructura-función de diferentes familias de antibióticos con capacidad de inhibir la agregación amiloide de proteínas y logramos descifrar un motivo estructural común a todas ellas que sentaría importantes bases para el diseño racional de fármacos. En base a este motivo estructural, analizamos diferentes análogos estructurales y pudimos encontrar que una tetraciclina químicamente

modificada denominada CMT-3 posee mayor eficiencia antiagregante y neuroprotectora que doxiciclina, conservando la propiedad de atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica. Esta molécula posee además la ventaja de interaccionar con especies fibrilares maduras de  $\alpha$ -sinucleína, induciendo su desensamblaje. Esta propiedad, sumada a su baja actividad antibiótica le confieren propiedades únicas como antiagregante, antioxidante y antineuroinflamatoria que convierten a CMT-3 en un fármaco ideal para entrar a la fase de pruebas clínicas en EP.

Los resultados presentados posicionan a la doxiciclina y CMT-3 como nuevas estrategias terapéutica en la EP y en otras sinucleinopatías

Palabras claves: Enfermedad de Parkinson,  $\alpha$ -sinucleína y agregación amiloide



---

# *I. Introducción*

---

*“Lo verdaderamente importante es nunca dejar de hacerse preguntas”*

Albert Einstein

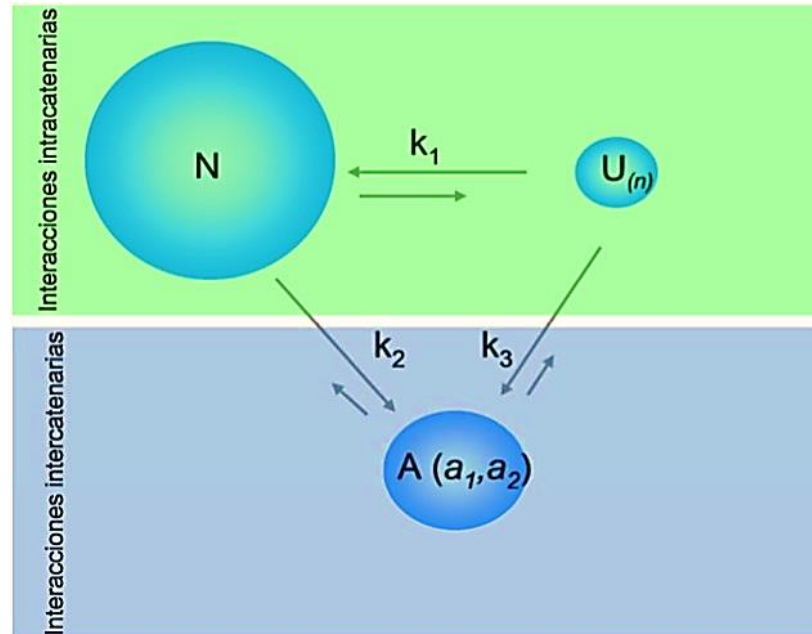
### **I.1 Plegamiento proteico**

Las proteínas son moléculas complejas imprescindibles para la estructura y las diferentes funciones celulares. Una vez que la cadena polipeptídica emerge recién sintetizada a partir de los ribosomas, sin ningún elemento de estructura secundaria o terciaria definido (estado U), el ambiente acuoso empuja a las proteínas conocidas bajo el nombre de globulares o fibrosas a un proceso de plegamiento donde adquieren estructura secundaria, terciaria y cuaternaria que les permite ocultar sus residuos hidrófobos, generando nuevas interacciones no covalentes en el sistema que reducen el  $\Delta G^0$  del sistema. En la naturaleza es muy común encontrar proteínas/péptidos con un plegamiento característico que cumplen una función biológica determinada, a este estado se convino en denominarlo estado nativo (N) (1). El estado N tiene una conformación tridimensional casi única y definida, pero en la que ocurren pequeños cambios estructurales relacionados con la actividad fisiológica de la proteína. Por el contrario, el estado desplegado esta conformado por una población heterogénea de conformaciones (U), que van intercambiándose rápidamente en el cual ninguna molécula es igual a otra ( $U_{1,2,...,n}$ ). Tradicionalmente se asoció la función de una proteína a su capacidad para adquirir una estructura tridimensional definida. Sin embargo, cada vez se describen más proteínas que son capaces de desarrollar una función específica sin ningún tipo de estructura terciaria o en un estado desplegado (U). En efecto, las proteínas llamadas PIDs (proteínas intrínsecamente desordenadas) pueden adquirir un estado compacto, pero carecen de una estructura terciaria o cuaternaria presentando sólo pequeños segmentos de estructura secundaria no relacionados entre sí. Esta característica hace que las PIDs sean estructuralmente muy similares al estado U y sin embargo desempeñan importantes funciones fisiológicas (2).

Es primordial destacar que, en el medio intracelular, la alta concentración de proteínas modifica el equilibrio de las reacciones de plegamiento impulsando a alcanzar nuevos estados como el denominado agregado (A) (Figura I.1.).

La agregación de proteínas es un evento frecuente en la naturaleza y por definición todas las proteínas tienen la capacidad de autoensamblarse en una variedad de estructuras capaces de realizar diferentes funciones en el mundo biológico (3). Actualmente podemos caracterizar principalmente dos tipos de estados agregados: el amorfo que no presenta ningún patrón de orden estructural (a1), y un agregado altamente organizado llamado amiloide que se ensambla formando estructuras fibrilares (a2). Las fibras amiloides pueden

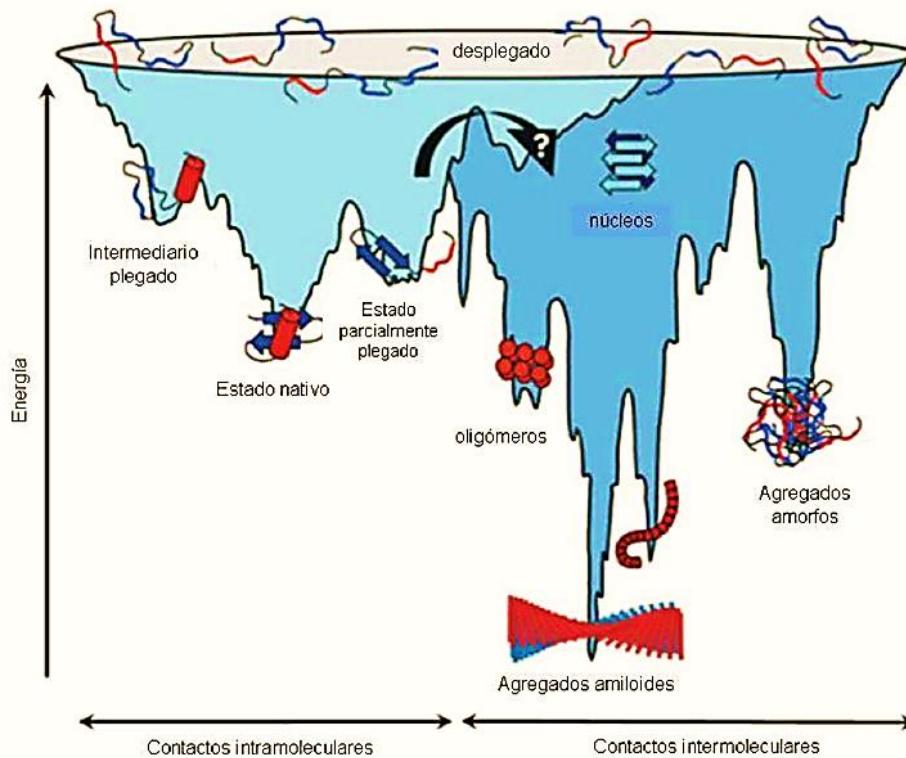
formarse a partir de una proteína con estructura tridimensional establecida o de una PID adquiriendo una estructura cuaternaria característica que resulta en estructuras fibrosas insolubles que se describirán posteriormente.



**Figura I.1. Representación esquemática del equilibrio de plegado de una proteína.** N representa la población de proteína en su estado nativo, U es la población en estado desplegado, y A es el estado agregado (a1. agregado amorfo y a2. agregado amiloide). Adaptado de "The key role of membranes in amyloid formation from a biophysical perspective" Torres-Bugeau y colaboradores.

En condiciones fisiológicas, la constante de equilibrio de la transición de  $U \leftrightarrow N$  es  $K_{eq} = [N] / [U] > 1$ , lo que implica que el proceso de plegamiento de una proteína es termodinámicamente favorable, es decir, es un proceso espontáneo. Sin embargo, el estado plegado (N) se considera metaestable ya que por lo general es sólo 5 a 10 kcal/mol más estable que el estado desplegado (U) (4). Esto implica que pequeñas fluctuaciones en el medio pueden desplazar el equilibrio del estado nativo al estado desplegado y, bajo ciertas condiciones, alcanzar el estado A que es energéticamente el más favorable.

Para que una proteína transite entre los estados  $N \rightarrow U$  existen diferentes alternativas posibles involucrando distintos estados intermedios (5, 6). Algunos de estos estados pueden quedar atrapados en mínimos energéticos locales capturando la proteína en un estado que es propenso a la agregación (Figura I.2.).



**Figura I.2. Representación esquemática de la variación de la Energía libre de los diferentes estados conformacionales accesibles durante la reacción de plegamiento.** Adaptado de “The Yin and Yang of protein folding” Jahn y Radford (7).

El estudio de los factores que controlan la agregación tipo amiloide tuvo un gran desarrollo en la última década debido a la relación de estas estructuras con diferentes patologías humanas, como así también a la explotación biotecnológica de estas superestructuras como nuevos nanomateriales.

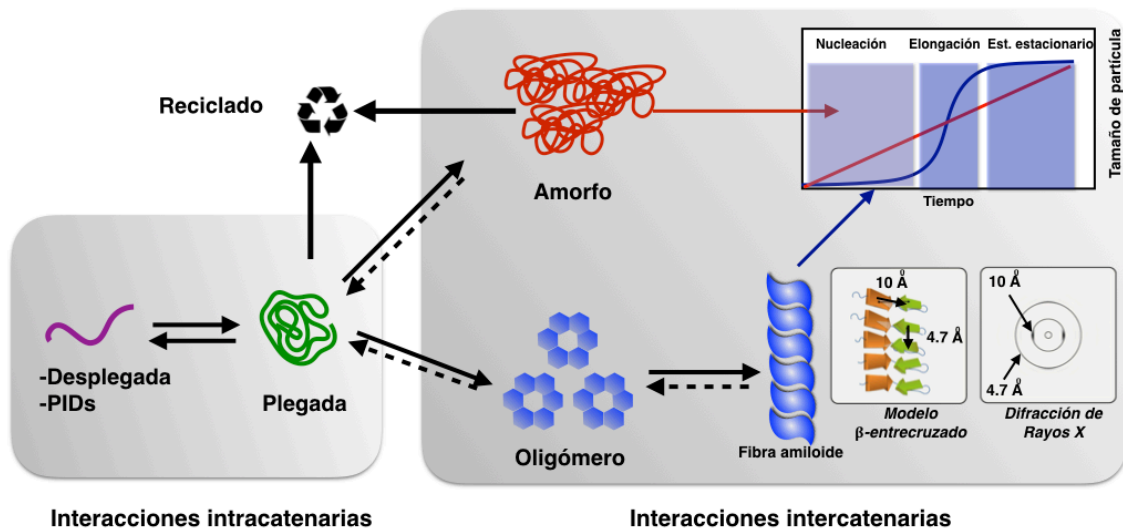
### ***1.1.1. La agregación amiloide***

Las fibras amiloides son agregados proteicos estables, ordenados, insolubles y resistentes a la degradación mediada por proteasas. Desde el punto de vista estructural, se caracterizan por la presencia de una estructura denominada  $\beta$ -entrecruzada (8). Esta disposición conformacional, confiere a las proteínas resistencia a proteólisis, desnaturalización y a mecanismos generales de eliminación presentes en la célula.

La reacción de formación de agregados amiloides ocurre de modo secuencial, con una primera etapa que depende de la proteína de origen. En una proteína globular por ejemplo, los residuos hidrofóbicos están mayormente ocultos dentro de la estructura plegada y es necesario un cambio conformacional que los exponga parcialmente para gatillar el proceso de agregación (3). Para las PIDs el primer paso en la agregación está

relacionado a cambios conformacionales sutiles que desplazan al conjunto de estructuras desde estados compactos a estados extendidos que son más propensos a la agregación (9).

La mayoría de las fibras amiloides se producen a través de un mecanismo de nucleación-polimerización (Figura I.3). De acuerdo a experimentos *in vitro* la formación de especies agregadas transita por una fase de latencia durante la cual se forman núcleos de polimerización, una fase de rápido crecimiento exponencial y por último, una fase estacionaria donde el número de especies agregadas parecería ser constante. El monitoreo de este comportamiento en función del tiempo puede ser ajustado a una función sigmoidea (10, 11). Por el contrario, en el proceso de formación de agregados amorfos la aparición de especies agregadas ajusta a una función lineal con el tiempo.



**Figura I.3. Representación de la vía de agregación de proteínas *in vitro*.** Las proteínas desplegadas o intrínsecamente desordenadas (PIDs) (en color violeta) se pliegan en a su estado funcional nativo (plegado, verde). Pequeños cambios en el ambiente celular pueden llevar al mal plegamiento de las proteínas y el equilibrio podría inclinarse hacia fibrillas de amiloide (azul) o agregados amorfos (rojo). El ensamblaje de los oligómeros (celeste) precede al de las fibras amiloides, que se caracterizan por un patrón específico de difracción de rayos X debido a su estructura β-entrecruzada (recuadro). Adaptado de “*Lessons learned from protein aggregation: toward technological and biomedical applications*”, Ávila y colaboradores (8).

Durante la fase de latencia las primeras especies agregadas forman unidades esféricas llamadas núcleos u oligómeros solubles que son capaces de reclutar especies monoméricas generando estructuras en crecimiento dinámico. De esta manera, estas especies son capaces de actuar como núcleos de polimerización acelerando la conversión de una muestra fresca de monómeros hacia fibras amiloides. Por el contrario, los agregados amorfos no poseen esta característica ya que las especies agregadas no pueden actuar como núcleos de polimerización.

A medida que avanza el proceso de agregación amiloide, las primeras especies no esféricas que aparecen se denominan protofibrillas las que a su vez pueden entrelazarse dando origen a protofilamentos. Finalmente, múltiples protofilamentos enrollados alrededor de un eje forman una fibra amiloide. Cuando la fibra alcanza alrededor de 10 nm de diámetro y varios micrómetros de longitud se la define como fibra madura (12, 13).

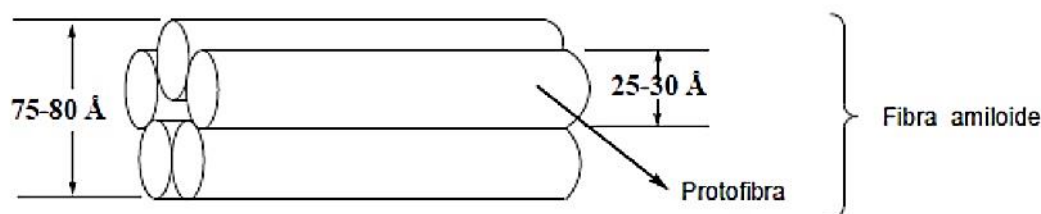
La caracterización de las especies agregadas es esencial para poder entender el proceso de agregación amiloide. Si bien las fibras maduras pueden estudiarse por diferentes métodos biofísicos con técnicas microscópicas, difracción de Rayos X, RMN en fase sólida, FT-IR, espectroscopía de fluorescencia entre otras, las especies prefibrilares son complejas de analizar debido a la naturaleza heterogénea y dinámica de las mismas. Por lo tanto, no existe un consenso absoluto sobre las características, el tamaño y la morfología para definir a las diferentes especies intermedias a las que se hace referencia frecuentemente en la literatura, aunque una clasificación introducida por Kodali y Wetzel (14) se encuentra entre las más citadas.

En este contexto, la cinética de agregación de una proteína medida por el aumento en el tamaño de las partículas, así como por su capacidad de usar sus núcleos como semillas, proporciona una herramienta excelente para discernir rápidamente el tipo de agregación que la proteína está experimentando. Obviamente, para la caracterización estructural y morfológica de los agregados se utiliza la microscopía electrónica de barrido (MEB), microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía de fuerza atómica (AFM), difracción de Rayos X.

### ***1.1.2. Caracterización estructural y morfológica de los agregados amiloides***

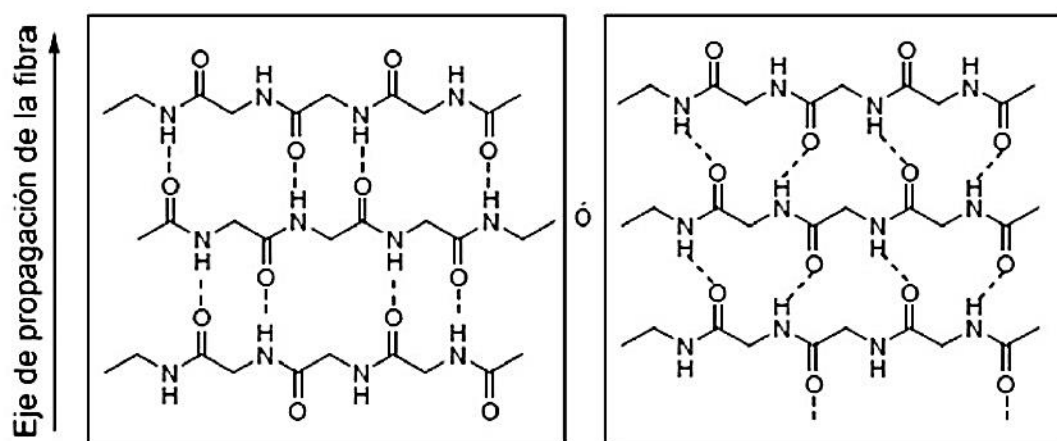
En 1959 se describieron morfológicamente por primera vez las fibras amiloides gracias al uso de la microscopía electrónica. Cohen y colaboradores realizaron microscopía electrónica de transmisión de tejidos de pacientes con amiloidosis primarias y secundarias, así como de las fibras obtenidas experimentalmente *in vitro* (15). Estos estudios demostraron que los depósitos amiloides exhiben una estructura sub-microscópica parecida: haces de fibras rectas, rígidas, que van de 60 a 130 Å de diámetro y de 1000 a 16.000 Å de longitud. Posteriormente, Gueft y Ghidoni sugirieron que las fibras amiloides son dobles, con un espacio intrafibrilar aproximadamente igual al diámetro de cada componente (25 Å) (16). Shirahama y Cohen llevaron a cabo extensos

estudios estructurales de la fibra amiloide en los tejidos (17), y junto a estudios de Cohen y colaboradores (1982) se obtuvo consenso para la descripción de una estructura fibrilar amiloide. Este modelo, aún vigente, sostiene que cada fibra presenta un diámetro de 75-80 Å y se encuentra formada por protofibras de 25-35 Å (Figura I.4) las que a su vez se encuentran constituidas por sub-protofibras de 10-15 Å.



**Figura I. 4. Fibra amiloide.** Representación del primer modelo de fibra amiloide propuesto por Shirahan y Cohen (17).

En 1951, Pauling y Corey utilizando difracción de rayos-X lograron una descripción estructural a baja resolución de las fibras amiloides donde se observaba un patrón estructural común conocido como estructura lámina  $\beta$ -entrecruzada (18). En esta estructura las láminas  $\beta$ , ya sean paralelas o anti-paralelas, se disponen de forma perpendicular al eje de la fibra. Los puentes de hidrógeno de la cadena principal que estabilizan a la estructura  $\beta$ -entrecruzada se disponen en dirección paralela al eje de elongación de la fibra (Figura I.5) formando una extensa red que permite explicar la extraordinaria estabilidad de este tipo de fibras.



**Figura I.5. Modelo de lámina  $\beta$ -entrecruzada en una fibra amiloide:** anti-paralela (izquierda) y paralela (derecha).

Si bien mediante el uso de técnicas como microscopía electrónica y de fuerza atómica se pudieron caracterizar morfológicamente a las fibras amiloides, una caracterización estructural a nivel de detalle atómico es muy difícil de alcanzar debido a las limitaciones de las técnicas tradicionales de alta resolución. Por un lado, las fibras no son estructuras cristalinas y por lo tanto su resolución por cristalografía de rayos X es muy compleja. Por otro lado, estas estructuras son demasiado grandes para ser resueltas por resonancia magnética nuclear (RMN). Con el advenimiento de nuevas técnicas estructurales como resonancia magnética de estado sólido, o la criomicroscopía electrónica mejoró notablemente la información de la organización interna de las fibras amiloides (19).

Otra de las técnicas utilizadas para la caracterización de las fibras amiloides es la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (denominada FT-IR), la cual tiene un lugar importante en el análisis y en la comprensión de los mecanismos complejos de agregación a nivel oligomérico y/o fibrilar. El FT-IR puede detectar fácilmente las estructuras  $\beta$ -entrecruzada ya que presenta una vibración característica en la banda Amida I (20). Aunque FT-IR es una técnica estructural de baja resolución, tiene la ventaja de proporcionar información dinámica de los cambios conformacionales que ocurren durante la agregación (21, 22). Una ventaja adicional del FT-IR es que es particularmente sensible a las estructuras  $\beta$  y puede diferenciar entre arreglos  $\beta$  paralelos, anti-paralelos (23) así también como las estructuras  $\beta$ -entrecruzada presentes en los agregados amiloides (24).

Las características estructurales únicas de los agregados amiloides les confieren una serie de propiedades esenciales para su identificación que se resumen a continuación:

1. Aspecto blanquecino y homogéneo, se tiñen con el colorante aniónico eosina.
2. Se tiñen con el colorante aniónico Rojo Congo en medio alcalino, y muestran birrefringencia verde manzana al ser observados en el microscopio de luz polarizada (25).
3. Poseen estructura fibrilar cuando se observan en el microscopio electrónico (15) o de fuerza atómica.
4. Muestran un patrón de difracción de rayos-X de tipo hebra  $\beta$  cruzado. Esta estructura se conoce actualmente como  $\beta$ -entrecruzada debido a sus señales de difracción características en 4.7 y 10 Å (18) (Figura I.3).
5. Son afines a los colorantes Tioflavina T y Tioflavina S, con los que forman complejos fluorescentes (26).



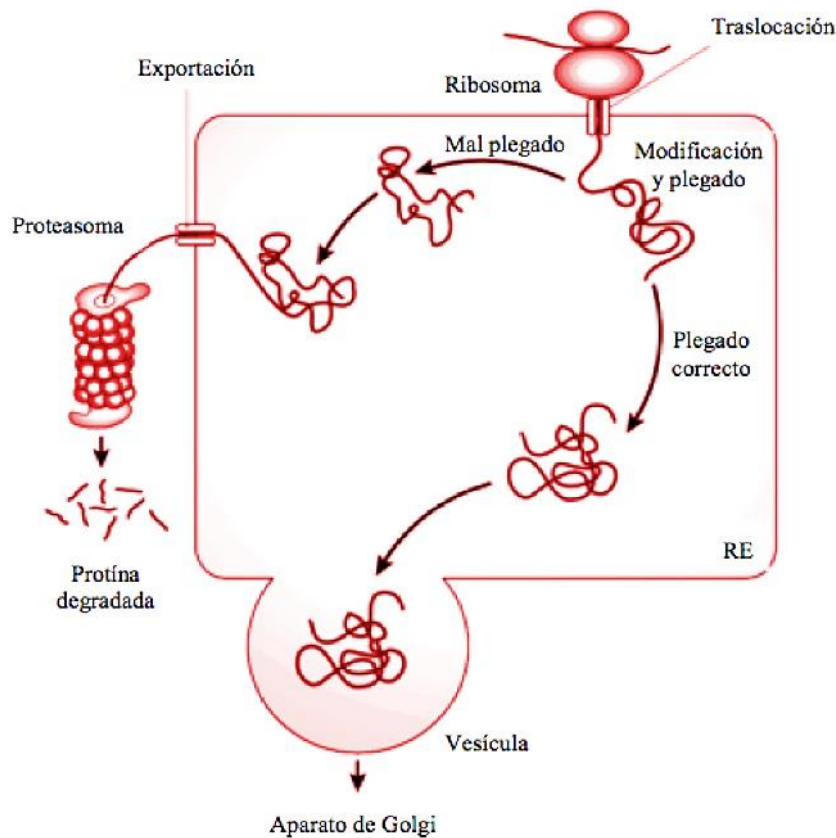
### ***1.1.3. Plegamiento in vivo y proteostasis celular***

Dentro de las células, una vez terminado el proceso de traducción, la proteína nascente debe adquirir una conformación que la haga funcionalmente activa. Para ello es necesaria una interpretación eficiente de la información contenida en la secuencia primaria de aminoácidos con el fin de alcanzar el estado nativo o funcional, garantizando que esta cumpla las condiciones cinéticas y termodinámicas impuestas por su entorno fisiológico ( $\Delta G^0$  mínimo). Del mismo modo que en el plegamiento *in vitro*, la exposición de residuos hidrófobos de la proteína nascente aumenta en gran medida su energía libre y se transforma en la fuerza directriz del plegamiento gracias a la propensión a esconder rápidamente estas regiones no polares en el interior de la molécula. Las interacciones hidrofílicas como puentes salinos y enlaces disulfuro limitan el número de conformaciones alcanzables por la cadena polipeptídica permitiendo la finalización del proceso de plegamiento en un período de tiempo biológicamente aceptable (alrededor de 1ms).

El plegamiento *in vivo* puede ser co-traducciona, iniciándose antes de la finalización del proceso de síntesis mientras que la cadena nascente todavía está unida al ribosoma (27) o post-traducciona. Respecto al compartimento celular donde se lleva a cabo el plegamiento, hay proteínas que experimentan la mayor parte de este proceso en el citoplasma mientras que otras lo hacen en organelas específicas como retículo endoplásmico (RE) o mitocondrias a medida que se transloca a través de las membranas (28, 29).

Para que las proteínas globulares alcancen su estado nativo en las células, se requiere de un grupo de proteínas auxiliares, conocidas como chaperonas moleculares. Se trata de una serie de proteínas que se han conservado a lo largo de la evolución, y se encuentran en todas las organelas y en los compartimentos celulares encargados de la síntesis o la modificación post-traducciona de proteínas. Estas moléculas no llevan a cabo el proceso de plegamiento como tal ni forman parte de la estructura funcional final de la proteína, sino que actúan como catalizadores de las etapas limitantes de la reacción de plegamiento. Las chaperonas más comunes encontradas en el espacio intracelular pertenecen a la familia de proteínas de choque térmico (*del inglés, HSPs, Heat Shock Proteins*) y se las clasifica de acuerdo a su peso molecular en HSP40, HSP60 (incluyendo las chaperoninas GroEL/GroES y TRiC/CCT), HSP70 (como la GRP78/BiP *Binding Protein*) y HSP90. Las lectinas, como la calnexina y la calreticulinas, son consideradas

también eficientes chaperonas. Otras proteínas también esenciales en el proceso de plegamiento son las proteínas disulfuros isomerasas (PDI) y las peptidil-prolil cis-trans isomerasas (PPI). Estas chaperonas a menudo trabajan en conjunto para garantizar que las diversas etapas del proceso de plegamiento de una proteína se completen de manera eficiente y además son las encargadas del transporte de estas hacia diferentes compartimentos celulares.



**Figure I.6. Regulación del plegamiento de proteínas in vivo.** Muchas proteínas recién sintetizadas se trasladan al RE donde se pliegan en sus estructuras tridimensionales. Las proteínas plegadas correctamente luego se transportan al complejo de Golgi y de allí se envían al medio extracelular. Sin embargo, las proteínas plegadas incorrectamente se detectan mediante un mecanismo de control de calidad y se envían por medio de otra vía para ser ubiquitinadas, para luego ser degradadas en el citoplasma por el complejo de proteosoma. Adaptado de “*The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation*” Kaufman y colaboradores (30).

Las células además poseen una serie de mecanismos en las que chaperonas también juegan un rol esencial en el control de calidad del proceso traducción-plegamiento siendo capaces de detectar proteínas mal plegadas (28, 29). Actualmente, el mecanismo mejor descrito para el sistema de “control de calidad del plegamiento proteico” es el del RE (Figura I.6) (30–32). Dentro del RE, existen chaperonas específicas que identifican proteínas mal plegadas mediante un sofisticado mecanismo de control de

calidad y las dirigen a la vía de degradación denominada ERAD (ER-Associated Degradation). En situaciones en las que la cantidad de proteínas con defectos en el plegamiento excede la capacidad de plegamiento del RE, se produce una situación de estrés que activa un mecanismo de defensa denominado Respuesta a Proteínas Desplegadas (*del inglés, UPR, Unfolded Protein Response*). Este mecanismo se basa en inducir la expresión de las chaperonas moleculares y los componentes de la ERAD, atenuando simultáneamente la síntesis de proteínas para disminuir su cantidad en el RE. El mal funcionamiento de la UPR puede estar provocado por mutaciones genéticas, envejecimiento o factores ambientales, y actualmente constituyen uno de los mecanismos de toxicidad en las proteopatías como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, las encefalopatías espongiformes y la diabetes tipo II (33–37).

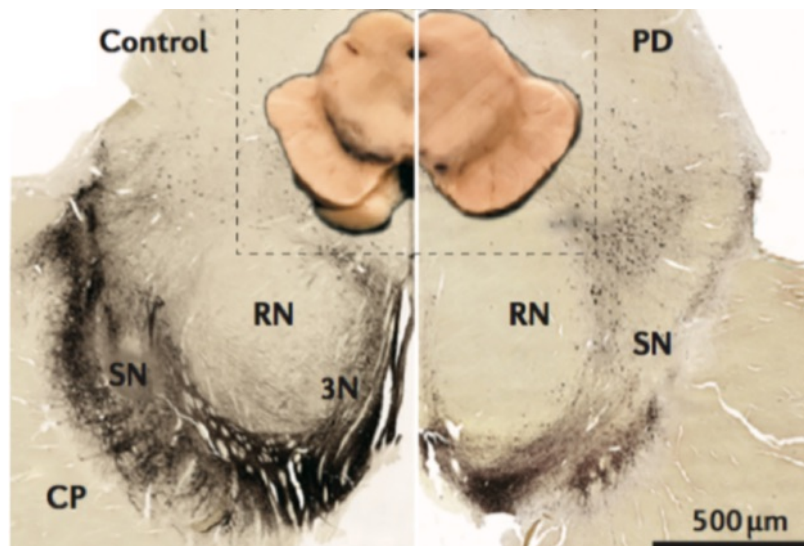
### **I.2. La Enfermedad de Parkinson: una patología relacionada a la acumulación de agregados proteicos**

La Enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo de mayor incidencia poblacional después de la enfermedad de Alzheimer, con una prevalencia del 2-3% de la población en personas mayores de 65 años. Esta cifra se duplica cuando se considera la franja etaria de 80 años, por lo que el envejecimiento es considerado el principal factor de riesgo de esta enfermedad (38, 39). Las estimaciones de incidencia mundial de la enfermedad de Parkinson varían de 5 a 35 casos nuevos por cada 100.000 individuos por año (40).

La EP es una enfermedad crónica y progresiva que frecuentemente es clasificada como un trastorno del movimiento, pero que también se manifiesta a través de síntomas no motores como alteraciones en la función cognitiva, trastornos del sueño, depresión e hiposmia (capacidad disminuida de percibir los olores), alteraciones en la expresión de las emociones y en la función autónoma. Actualmente, se cree que esta enfermedad se desencadena por una combinación de susceptibilidad genética y exposición a uno o más factores ambientales (41).

Histopatológicamente se caracteriza por la muerte de neuronas dopaminérgicas en una región específica del cerebro denominada *sustancia nigra pars compacta* (Figura I.7), y por la formación de inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy (LB) en las neuronas sobrevivientes (42). Normalmente, estas neuronas producen dopamina, un mensajero químico responsable de transmitir señales entre la sustancia negra y el cuerpo estriado para producir movimientos suaves y decididos. La muerte de las neuronas

dopaminérgicas resulta en una disminución en la síntesis de este neurotransmisor induciendo patrones anormales de activación nerviosa dentro del cerebro.



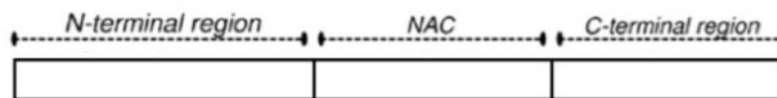
**Figure I.7.** Representación de la sustancia nigra en un paciente normal (derecha) y en un paciente con enfermedad de Parkinson (izquierda).

La etiología de la muerte neuronal es discutida, sin embargo, actualmente se acepta que especies agregadas de  $\alpha$ -sinucleína serían los principales agentes citotóxicos (43). Si bien factores como estrés oxidativo, mal funcionamiento mitocondrial, neuroinflamación, mal funcionamiento en la homeostasis de calcio y transporte axonal retrogrado de neurotoxinas han sido involucrados en la patología (44), es posible que todos confluyan en un círculo vicioso cuya retroalimentación amplificaría el daño neuronal y la evolución de la patología.

### ***1.2.1. Estructura, localización y fisiopatología de la proteína $\alpha$ -sinucleína***

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos que se expresa en neuronas y en otros grupos celulares incluidos los melanocitos y los glóbulos rojos (45, 46). Desde el punto de vista estructural, está descrita como una proteína intrínsecamente desordenada, aunque puede adquirir ciertos elementos de estructura secundaria después de la interacción con una serie de ligandos u otras proteínas (47, 48). La secuencia primaria puede ser dividida en tres segmentos (Figura I.8): la región N-terminal (residuos 1-60) contiene de seis o siete repeticiones de la secuencia consenso KTKGV que permiten la interacción con membranas a través de la formación de una hélice anfipática (49–51); la región NAC (*del inglés Componente No Amiloide-beta*, residuos 61-95) rica en residuos hidrofóbicos directamente relacionada con el potencial amiloidogénico de la

proteína; y la región C-terminal (residuos 96-140), rica en residuos de ácido aspártico, ácido glutámico y prolina, que podría estar involucrada en interacciones proteína-proteína como así también en la inhibición intrínseca de la agregación amiloide (52).



**Figura I. 8. La molécula de  $\alpha$ -sinucleína.** Regiones de  $\alpha$ -sinucleína: extremo N-terminal, Región hidrofóbica (NAC) y extremo C-terminal.

En cuanto a su localización celular, es común encontrar  $\alpha$ -sinucleína en las terminales pre-sinápticas como consecuencia de la alta preferencia de la proteína por membranas cargadas negativamente y con gran curvatura (53, 54). Esta localización le permite a la proteína  $\alpha$ -sinucleína interactuar con diferentes proteínas sinápticas involucradas en el tráfico de membranas, exocitosis y liberación de vesículas sinápticas en células neuronales (55, 56).

Si bien la función fisiológica de la  $\alpha$ -sinucleína no está claramente dilucidada, se la relacionó al mantenimiento del flujo de vesículas sinápticas en terminales pre-sinápticas maduras. En las mismas, interactúa con las proteínas CSP- $\alpha$  y SNAREs para prevenir la neurodegeneración (57) y actúa como una chaperona molecular en el normal ensamblado del complejo SNARE. Sin embargo, la  $\alpha$ -sinucleína parece no ser esencial para el desarrollo neuronal o de la sinapsis ya que durante el desarrollo sináptico no se detecta su expresión (58). Así también se demostró que ratones *knockout* para  $\alpha$ -sinucleína desarrollan una arquitectura cerebral y conexiones sinápticas normales con solo leves anomalías en la liberación de neurotransmisores (59, 60) .

Además, la  $\alpha$ -sinucleína puede regular negativamente la expresión y la actividad de la tirosina hidroxilasa, enzima que cataliza la conversión del aminoácido L-tirosina al precursor de la dopamina. En efecto, la  $\alpha$ -sinucleína mantiene la tirosina hidroxilasa desfosforilada para reducir la expresión de dopamina lo cual aumenta la degeneración neuronal dopaminérgica (61). También se asocia la  $\alpha$ -sinucleína con la inhibición de la fosfolipasa D2, enzima que hidroliza la fosfatidilcolina hacia ácido fosfatídico y diacilglicerol, ambos moduladores intracelulares de la neurotransmisión (62, 63).

También se postuló que la  $\alpha$ -sinucleína podría estar involucrada en la regulación de la actividad mitocondrial. Alteraciones en la expresión de la proteína dan lugar a una mitocondria disfuncional que genera especies reactivas de oxígeno llevando a un

desbalance oxidativo (64). Además, se observó que el nivel de sobreexpresión de la proteína se correlaciona con el nivel de fragmentación mitocondrial a través de la unión a la membrana interna de las mitocondrias (65, 66).

El rol fisiopatológico de la  $\alpha$ -sinucleína fue asociado principalmente al proceso de formación de agregados amiloides. En efecto, uno de los principales criterios histopatológicos para el diagnóstico de la EP es la presencia *ex vivo* de cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas de 8-30  $\mu$ m de diámetro, formados fundamentalmente por fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína de 7-27 nm de diámetro dispuestas radialmente (67). Además, se encontró que cuatro mutaciones familiares, A30P, E46K, H50Q y A53T así como la triplicación del gen de la  $\alpha$ -sinucleína, relacionadas a una mayor propensión a la agregación, causan una forma precoz y agresiva de la EP, confirmando el rol principal de los agregados en el desarrollo de la enfermedad (68).

Actualmente se encuentra discutida cuál es la especie agregada responsable de los efectos neurotóxicos, sin embargo, se postuló que los agregados pre-fibrilares y no las fibras maduras de  $\alpha$ -sinucleína son los responsables de tal efecto. Esto pudo demostrarse tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Los estudios *in vitro* demostraron que las mutaciones A53T y A30P vinculadas en las etapas tempranas en la EP están asociadas a una aceleración de la formación de las especies pre-fibrilares, y no la de formación de fibras (69). En los modelos *in vivo* de *C. elegans* y *D. melanogaster*, se observó que la sobreexpresión de mutantes de  $\alpha$ -sinucleína con capacidad de formación de fibras alterada causó una mayor toxicidad. Esta incapacidad de las mutantes de formar fibras se correlacionó directamente con la toxicidad y el proceso de neurodegeneración (70). Por otro lado, se observó que las mutaciones que favorecen la formación de especies pre-fibrilares causaron la muerte de células dopaminérgicas más prominentes tras la inyección lentiviral en la *sustancia nigra* de la rata (SN) (71). En conjunto, estos estudios proporcionan evidencia de que los agregados tóxicos podrían ser las especies pre-fibrilares solubles presentes en la EP.

Muchos han sido los factores estudiados responsables de influenciar en la acumulación y la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, ya sea a través de la modificación directa o indirecta de la proteína. Modificaciones post-traduccionales como la fosforilación de residuos de serina y tirosina, la acetilación del extremo amino-terminal del residuo de metiltransferasa, la ubiquitinación y la sumoilación de residuos de lisina, y la O-GalNAcetilación de residuos de serina y treonina han demostrado que pueden influir

sobre las propiedades tanto fisiológicas como amiloidogénicas de la  $\alpha$ -sinucleína (72). Por otro lado, la sobre-expresión de proteína puede llevar a una desregulación de su degradación, provocar la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína y promover la neurodegeneración (73). La falla en los mecanismos de defensa frente a la acumulación y agregación de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro de pacientes con edad avanzada jugaría un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (74, 75), ya que puede llevar a una propagación de las especies agregadas en el sistema nervioso central (SNC).

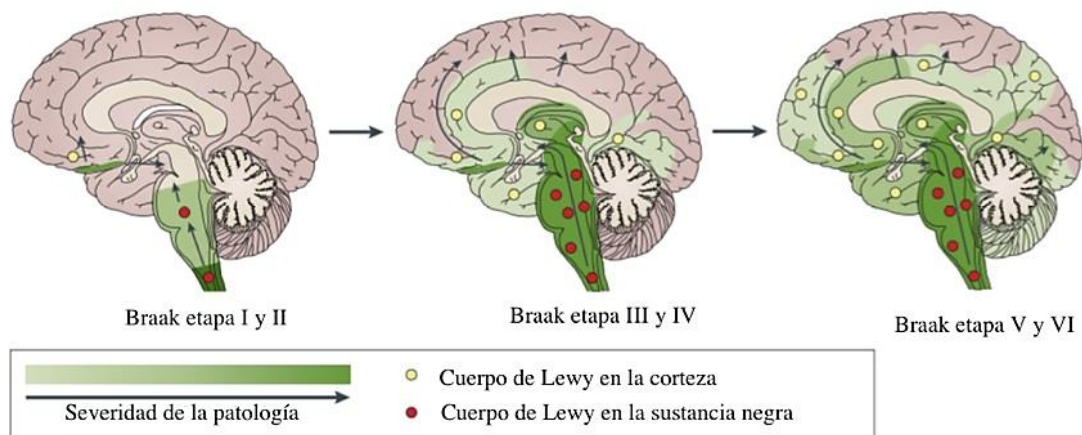
### ***1.2.2. Propagación prionoide de la proteína $\alpha$ -sinucleína***

En 1982 Stanley Prusiner acuñó el término de prion, definiéndolo como un agente proteico infeccioso resistente a la inactivación inducida por la mayoría de los métodos convencionales que modifican a los ácidos nucleicos. Este agente infeccioso pudo ser aislado e identificado como la forma agregada de la proteína PrP responsable de las llamadas encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) (76). Los priones constituyen, por tanto, formas auto-replicativas de proteína que son capaces de propagarse no solo entre la progenie de una línea celular (transmisión vertical), sino también horizontalmente, entre distintos organismos, lo que les confiere su infectividad (77, 78). Muchas de las principales proteínas involucradas en las enfermedades neurodegenerativas como el péptido  $\beta$ -amiloide, la proteína Tau hiperfosforilada y la proteína  $\alpha$ -sinucleína, demostraron ser capaces de agregarse y propagarse entre células de la misma manera que los priones. Sin embargo, a la fecha no se reportó la transmisibilidad entre individuos de especies agregadas de la  $\alpha$ -sinucleína y por lo tanto, la “infectividad” no puede ser homologada en forma directa con el concepto de propagación proteica *in vitro* (79). Por ello a las especies agregadas de  $\alpha$ -sinucleína se las denomina “prionoides” o “*prion-like*” (79).

La hipótesis de la propagación prionoide de la  $\alpha$ -sinucleína en la EP está fundamentada en el hecho que las especies agregadas de la proteína pueden ser liberadas al espacio extracelular y posteriormente internalizadas por la neurona contigua (80), la microglía (81), o los astrocitos (82, 83) amplificando en cada neurona alcanzada el proceso de agregación acelerada por la presencia de estos núcleos “semilla”. En efecto, agregados de  $\alpha$ -sinucleína son capaces de propagarse a múltiples regiones del cerebro durante años o décadas después de iniciada la enfermedad. Desde el punto de vista anatómico este principio queda claramente evidenciado considerando que la acumulación



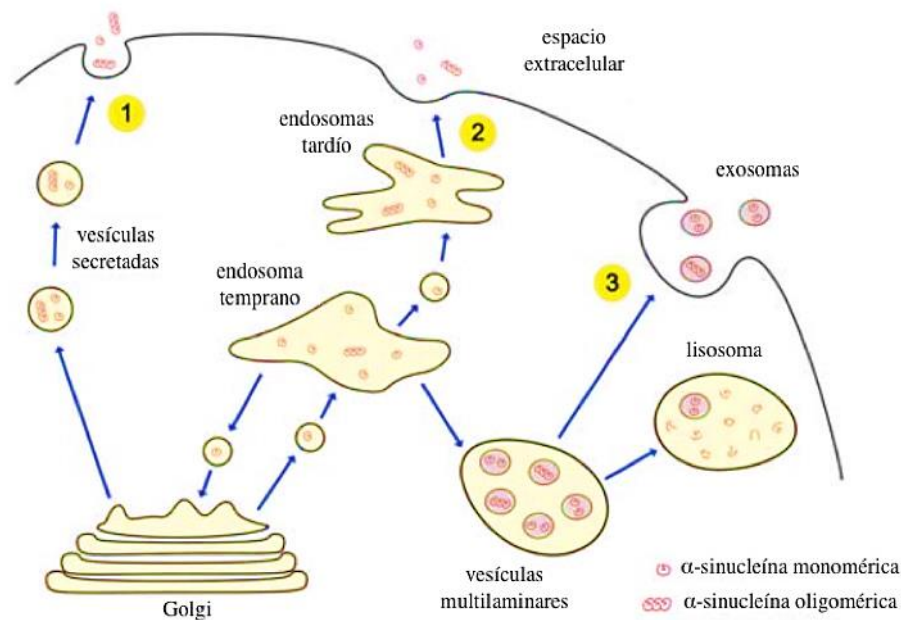
de especies tóxicas de  $\alpha$ -sinucleína empieza en el bulbo olfativo, se propaga por la médula oblonga hasta llegar al mesencéfalo y prosencéfalo como sugieren Braak y colaboradores (84) (Figura I.9). En línea con este modelo se planteó que la puerta de entrada de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína podría estar en los nervios entéricos del intestino y el bulbo olfatorio, donde comienzan los signos y síntomas prodrómicos asociados con la enfermedad de Parkinson tales como anosmia y estreñimiento (85, 86), antes de diseminarse y comprometer la *sustancia nigra*, que deriva en una disfunción motriz (87).



**Figura I.9. Progresión teórica de la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en la EP.** Las inclusiones de la  $\alpha$ -sinucleína se producen en las neuronas colinérgicas y monoaminérgicas del tronco cerebral en casos asintomáticos (etapa I y etapa II de Braak), infiltran neuronas similares en el cerebro medio y en el proencéfalo basal en pacientes con síntomas motores de la EP (etapa III y etapa IV de Braak), y luego se encuentran más tarde en las regiones cerebrales límbicas y neocorticales con progresión de la enfermedad (estadio V de Braak y estadio VI). Adaptado de “*The progression of pathology in Parkinson’s disease*” de Halliday y colaboradores (88).

En estudios llevados a cabo en cultivos celulares se demostró que un deterioro del sistema de la autofagia lisosomal contribuye a la diseminación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, ya que conduce a un aumento de la secreción de la proteína al espacio extracelular a través de los exosomas y que la endocitosis es un mecanismo clave de la captación de la  $\alpha$ -sinucleína extracelular (89, 90) (Figura I.10.). Además, hay evidencia de la transmisión intercelular de especies agregadas de  $\alpha$ -sinucleína tanto *in vitro* en experimentos de co-cultivos celulares como *in vivo* en ensayos donde se injertan células infectadas (91, 92).





**Figura I.10. Mecanismos propuestos para la secreción de la proteína  $\alpha$ -sinucleína.** La proteína se puede secretar tanto en sus formas monoméricas como agregadas mediante vías exocítica o endocítica. La  $\alpha$ -sinucleína puede integrarse directamente en vesículas secretoras y posteriormente liberarse por exocitosis (1). Alternativamente,  $\alpha$ -sinucleína se puede trasladar a los endosomas tempranos, desde ahí se puede liberar al espacio extracelular a través de los endosomas tardíos (2) o incorporarse a las vesículas multilaminares (VM) donde puede dirigirse a la degradación por fusión con lisosomas o a la secreción por fusión con la membrana plasmática, y la liberación de exosomas (3). Adaptado de “*Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death*”, Marques y colaboradores (93).

El efecto neurotóxico de las especies oligoméricas  $\alpha$ -sinucleína extracelulares se abordó en varios estudios. Los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína recombinantes pueden ser absorbidos por las neuronas en cultivo y desencadenar la muerte celular (94, 95). Además, el tratamiento de los medios condicionados que contienen  $\alpha$ -sinucleína derivado de neuronas con compuestos que interfieren con la formación de los oligómeros rescató a las células neuronales receptoras de la toxicidad (96). En conjunto, estos estudios indican que la  $\alpha$ -sinucleína extracelular tiene un papel importante en la progresión de los procesos patológicos relacionados con la EP, la propagación de los cuerpos de inclusión y en los procesos de neurodegeneración.

### ***1.2.3. Proceso de neuroinflamación: implicancias de las células gliales***

La secreción de la  $\alpha$ -sinucleína por las neuronas no solo induce toxicidad en el citoplasma de la neurona contigua, sino que también genera inflamación en el espacio extracelular, ya que pueden ser internalizados por la glía. Se ha descrito que los oligodendrocitos de la *sustancia nigra* y del tálamo presentan inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína.

También, los astrocitos del tronco del encéfalo muestran altos niveles de acumulaciones de la proteína.

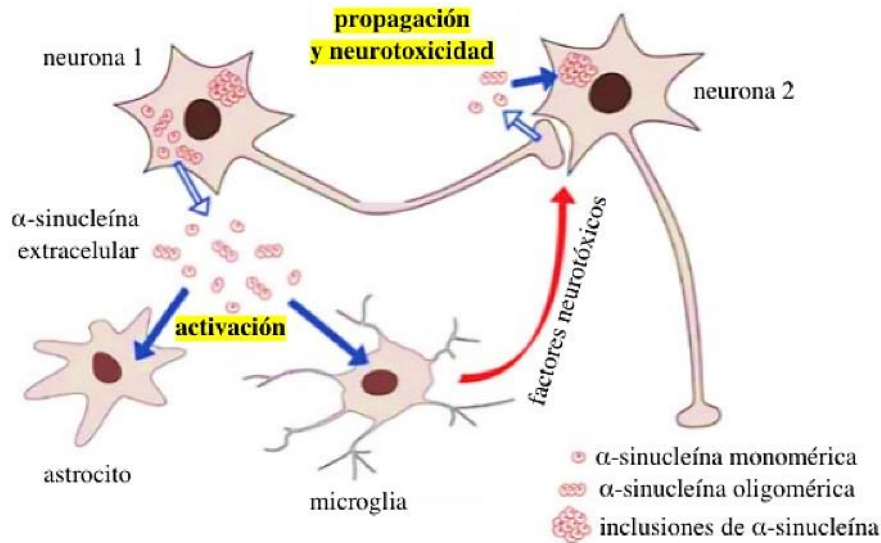
La interacción de células microgliales con especies agregadas de  $\alpha$ -sinucleína induce su activación, iniciando un programa específico que da como resultado la transformación gradual de una microglía ramificada en reposo a una forma ameboide activada (97, 98). Desde el punto de vista bioquímico, esta activación se traduce en la producción incrementada de los factores neurotróficos o factores proinflamatorios sumada a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (99, 100). Un número creciente de evidencias avalan la idea que el proceso neuroinflamatorio podría contribuir al inicio y/o al empeoramiento de la degeneración neuronal (83). Así, el análisis de muestras extraídas a partir de cerebros *post-mortem*, de imágenes cerebrales y de biomarcadores de fluidos muestran que la neuroinflamación es una característica destacada de la EP (101) y, aunque tal vez no sea el desencadenante inicial, la neuroinflamación probablemente sea un proceso esencial en la patología de la EP (102, 103).

Se pudo observar que en los fluidos biológicos (líquido cefalorraquídeo o suero) de pacientes con la EP los niveles de citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), la interleucina-2 (IL-2), la interleucina-6 (IL-6) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), se encontraron aumentados (104, 105).

Existe un vínculo estrecho entre el proceso de formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína y la neuroinflamación, ya que se observó en pacientes y en modelos de animales de la enfermedad de Parkinson, que la agregación de  $\alpha$ -sinucleína induce una respuesta de las células de la glía (103). Se postuló que los procesos de agregación y de inflamación se podrían potenciar mediante un ciclo vicioso de retroalimentación (Figura I.11).

Experimentos *in vitro* con células de microglía muestran una elevación en los niveles del óxido nítrico, el TNF- $\alpha$  y la IL1- $\beta$  ante la presencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína (106, 107). También, en experimentos de co-cultivo de neuronas-microglía se observó una activación de la microglía inducida por los agregados de  $\alpha$ -sinucleína lo que provocó una disminución en la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas. La capacidad de los agregados de activar la microglía también se demostró *in vivo* en ratones donde se inyectó  $\alpha$ -sinucleína humana en el SNC. Este tratamiento indujo la expresión

de citoquinas proinflamatorias, la expresión de marcadores endoteliales de la inflamación y la activación microglial (107).



**Figura I. 11. Rol de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en la neuroinflamación, la neurotoxicidad y la propagación de la patología.** La proteína  $\alpha$ -sinucleína puede ser secretada o liberada por neuronas moribundas al espacio extracelular. La  $\alpha$ -sinucleína extracelular puede activar los astrocitos y la microglía circundantes, lo que provoca una actividad proinflamatoria glial. Tras la activación, la microglía produce citoquinas proinflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, que pueden ser tóxicas para las neuronas. Además, la  $\alpha$ -sinucleína puede transferirse directamente entre las neuronas, lo que lleva a la propagación de un proceso de agregación de la proteína y compromete la viabilidad de la neurona receptora. Adaptado de “Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death”, Marques y colaboradores (93).

Además de los efectos sobre la microglía, se demostró que  $\alpha$ -sinucleína evoca respuestas en los astrocitos. La transferencia de la proteína  $\alpha$ -sinucleína de las neuronas a los astrocitos se evidenció tanto en cultivos celulares como *in vivo* en cerebros de ratones transgénicos que expresan la  $\alpha$ -sinucleína humana (82). La transmisión de  $\alpha$ -sinucleína neuronal condujo a la acumulación de la proteína en los astrocitos desencadenando la respuesta inflamatoria de los mismos.

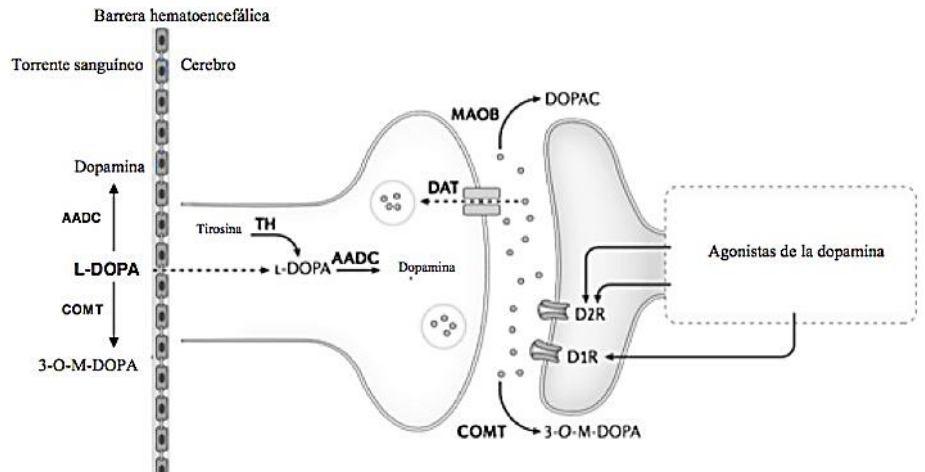
Todos estos diferentes estudios proporcionan evidencia sobre el papel de la  $\alpha$ -sinucleína extracelular en la modulación de la función glial y en la neuroinflamación, apoyando aún más la importancia del estudio de los mecanismos de agregación de  $\alpha$ -sinucleína para evitar que las especies patogénicas lleguen a activar las células de la glía y la muerte de las neuronas dopaminérgicas.

### **I.3. Tratamientos farmacológicos para la Enfermedad de Parkinson**

A grandes rasgos, todas las estrategias farmacológicas pueden ser clasificadas en modificadoras de la evolución de la enfermedad (preventivas) o en sintomáticas. Entre las primeras se cuenta a aquellas capaces de demorar, detener o revertir la progresión de la patología, mientras que las terapias sintomáticas están destinadas solo a paliar los síntomas de la enfermedad. A pesar de que ambas terapias son necesarias, en la actualidad únicamente están aprobados los tratamientos sintomáticos para su uso en clínica.

Dado que la mayoría de los síntomas de la EP son causados por la falta de dopamina en el cerebro, muchos tratamientos sintomáticos buscan reponer temporalmente la dopamina o imitar su acción (agonistas). Estos medicamentos se denominan dopaminérgicos y, por lo general, ayudan a reducir la rigidez muscular, mejoran la velocidad y la coordinación del movimiento, y disminuyen el temblor.

Entre los medicamentos de reposición de la dopamina, la L-DOPA (precursor de la dopamina) se ha mantenido como el medicamento estándar para los pacientes que padecen la enfermedad. Se utiliza la L-DOPA en lugar de la dopamina ya que tiene una mayor capacidad para pasar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, la biodistribución en el sistema nervioso se limita a un 2% y la mayor parte del fármaco que se administra puede actuar sobre blancos fuera del sistema nervioso donde además, se metaboliza. Las preparaciones actuales de la L-DOPA incluyen inhibidores del aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), por ejemplo la carbidopa o la benserazida, para prevenir el metabolismo periférico de la dopamina y mejorar su biodisponibilidad (Figura I.12.). El metabolismo periférico involucra también la orto-metilación de la L-DOPA a través de la catecol O-metiltransferasa (COMT). La inhibición de esta enzima en la periferia aumentará aún más la biodisponibilidad y la vida media de la L-DOPA, lo que es particularmente beneficioso en pacientes que han desarrollado disquinesia (108). La extensión de la duración del efecto de las dosis individuales de la L-DOPA a través de los inhibidores de la COMT se ha convertido en un tratamiento de primera línea en estos individuos, y actualmente hay tres preparaciones disponibles para uso clínico (109, 110). Otro tratamiento que permite extender la vida media de la L-DOPA es la utilización de inhibidores de la monoaminoxidasa tipo B. La oxidación a través de la monoaminoxidasa tipo B (MAOB) en células gliales es un mecanismo de eliminación importante para la dopamina liberada sinápticamente, junto a la re-captación pre-sináptica a través del transportador de dopamina (111).



**Figura I. 12: Esquema de blancos dopaminérgicos donde pueden actuar diferentes medicamentos contra la enfermedad de Parkinson.** Adaptado de “Parkinson disease”, Werner y colaboradores (44).

Una terapia alternativa a la L-DOPA lo constituyen los agonistas de los receptores dopaminérgicos. La acción de la dopamina en las neuronas está mediada a través de dos clases de receptores de dopamina (D1 y D2). Los dopaminomiméticos pueden ejercer su actividad estimulando en forma directa a los receptores de dopamina (agonistas receptores de dopamina). Estos agonistas se encuentran dirigidos principalmente hacia la familia de los receptores D2 y se introdujeron por primera vez en la terapia de la enfermedad de Parkinson en la década de 1970. Una ventaja importante de los agonistas de la dopamina es que poseen una vida media más larga que la L-DOPA, convirtiéndose en candidatos atractivos como terapias complementarias en pacientes con disquinesia inducida por la L-DOPA (112).

Empíricamente el tratamiento con la L-DOPA es el más efectivo porque a partir de éste se libera dopamina que tendría un mayor número de acciones en comparación a los agonistas de los receptores dopaminérgicos. Además de estimular los receptores de dopamina (D1 y D2), la dopamina también podría activar adrenoreceptores, nuevos sitios de dopamina, transportadores de dopamina y el receptor asociados a las aminorazas (113).

### ***1.3.1. Nuevas estrategias terapéuticas para prevenir la Enfermedad de Parkinson***

A pesar de todos los tratamientos existentes hoy en día para tratar pacientes con la EP, cabe destacar que estos tratamientos son sólo paliativos y no frenan el avance de

la enfermedad. Por esta razón, un gran reto en el área de la neurociencia es la búsqueda de nuevos medicamentos que tengan un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas y sobre las células de la glía, ya que estas dos últimas se encuentran altamente involucradas en el desarrollo de la enfermedad.

Hasta el momento, se desarrollaron varias moléculas las cuales mostraron un gran potencial en los estudios preclínicos, pero ninguna de ellas alcanzó un nivel de madurez suficiente que permita su aprobación para el uso en la clínica. Actualmente se están realizando diferentes ensayos clínicos con el objetivo de modificar la progresión de la enfermedad. Los ensayos en curso se resumen en la Tabla I.

Blanco	Compuesto	Fase	Ensayo clínico
<b>Antioxidante:</b> <i>Procesos de oxidación en el medio puede conducir a la muerte neuronal</i>	Glutación	Fase II b	NCT02424708
	Inosina	Fase III	NCT00833690
<b>Factores neurotróficos:</b> <i>Ayudan a restaurar y proteger las neuronas</i>	GDNF	Fase II	NCT03652363
	CERE-120	Fase II	NCT00985517
<b><math>\alpha</math>-sinucleína:</b> <i>Esta proteína se acumula en el cerebro y resulta tóxica para las neuronas</i>	AFFITOPE	Fase I b	NCT026189941
	NPT088	Fase I	NCT03008161
	NPT200-11	Fase I	NCT02606682
<b>Reutilización de compuestos:</b> <i>Elementos naturales o medicamentos aprobados para otras condiciones.</i>	Exenatida	Fase IV	NCT02455076
	Isradipina	Fase III	NCT02168842
	Parche de Nicotina	Fase II b	NCT01208935
	Nilotinib	Fase II	NCT03205488

**Tabla I. Terapias para prevenir, retardar o detener la progresión de la EP.** Las terapias están dirigidas a diferentes proteínas y vías conocidas que desempeñan un papel importante en la enfermedad.

Una alternativa que se está explorando es el uso de antioxidantes. Estos buscan atacar los efectos nocivos derivados del estrés oxidativo que podrían conducir a la degeneración celular. Entre ellos, el glutatión se propuso como terapia neuroprotectora para la EP durante décadas, pero su uso se vio limitado por la baja disponibilidad de la droga luego de su administración por vía oral o por las dificultades derivadas de su aplicación intravenosa (114). En un estudio reciente de Fase I, se demostró que la aplicación como aerosol por vía nasal constituye una terapia segura y tolerable. A pesar que durante este estudio se encontró una mejora de los síntomas clínicos de los pacientes, un estudio posterior de Fase IIb mostró que esta mejora no es significativamente superior frente al tratamiento con placebo al cabo de un período de tres meses (115). Otra propuesta exploró elevar los niveles de urato, un antioxidante natural, mediante el tratamiento con la inosina. A pesar que este tratamiento alcanzó un ensayo clínico de Fase III (116), tuvo que ser suspendido prematuramente ante la evidencia de que no afecta la progresión de la enfermedad de Parkinson (117).

Otra alternativa terapéutica que se encuentra bajo estudio es la administración de factores neurotróficos (118). Los factores neurotróficos son proteínas secretadas al medio extracelular que juegan un rol clave en el desarrollo del sistema nervioso central. Así por ejemplo, el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) sería capaz de restaurar las células nerviosas dañadas, incluyendo las células dopaminérgicas y protegerlas del daño. Desafortunadamente, este efecto que se observó en etapas preclínicas, no se vio reflejado en los estudios de fase clínica posteriores. Se cree que la causa de la falla estaría dada por la incapacidad de la droga de alcanzar su tejido blanco (119), por lo cual se están evaluando formas de administración directa en el putamen a través de un catéter (120). La neurturina (NRTN) es otro factor neurotrófico bajo evaluación. Para la administración del mismo se propuso la fusión con adenovirus de serotipo 2 (AAV2), formulación que se conoce como CERE-120. A pesar que los ensayos clínicos iniciales fueron prometedores demostrando la seguridad y la tolerabilidad del tratamiento (121), un estudio posterior más extendido no pudo demostrar una mejora en los pacientes que se sometieron al tratamiento, debido también a problemas del medicamento para alcanzar el blanco de acción (122). Actualmente se está realizando un seguimiento de pacientes que se sometieron a una inyección del medicamento directamente en el cuerpo estriado (123, 124).



Debido a la creciente evidencia de que las especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína causan la pérdida de neuronas dopaminérgicas en forma directa y/o a través de la activación de las células gliales, se esperaría que compuestos que actúen sobre la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína pongan fin a la progresión de la EP. Con este fin se desarrolló AFFITOPE, una vacuna que induce la producción de anticuerpos contra la  $\alpha$ -sinucleína (125, 126). Un estudio de Fase I demostró que la administración de la inmunización es segura, aunque el título de los anticuerpos decae con el tiempo por lo que se necesitarían refuerzos (127). También con el fin de aumentar la degradación de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína, se desarrolló el compuesto NPT088. El mismo se deriva de una proteína de cápside del bacteriófago M13, que presenta la capacidad de reconocer y remodelar agregados amiloides (128). Finalmente, NPT200-11 es una molécula pequeña desarrollada por la industria farmacéutica para inhibir la formación de los agregados tóxicos de  $\alpha$ -sinucleína, lo que resultó en una mejora en los exámenes de comportamiento, los neuropatológicos y los bioquímicos de ratones modelo de Parkinson que sobre-expresan la proteína (129).

### ***1.3.2. Acelerando el desarrollo de tratamientos farmacológicos a través del reposicionamiento de drogas***

La presión para encontrar un tratamiento neuroprotector se hace evidente a la luz de proyecciones que indican que las enfermedades neurodegenerativas serán la segunda causa más común de muerte después de las afecciones cardíacas (130), mientras que los costos derivados del cuidado de los pacientes alcanzarán los 6 billones de dólares para el año 2030 (131). Sin embargo, la evaluación de nuevas terapias es un proceso largo y costoso, que muchas veces se ve interrumpido por que los compuestos no pueden pasar las etapas de evaluación clínica. Una causa importante de fallo de los compuestos en estas etapas lo constituye su toxicidad o la baja disponibilidad en el órgano diana. Una aproximación que permite disminuir significativamente el tiempo, el costo y el riesgo del desarrollo farmacológico es la conocida como reposicionamiento de fármacos, e involucra explorar el uso de compuestos existentes contra nuevos blancos que se encuentran fuera del repertorio de indicaciones para el cual se aprobó originalmente. El reposicionamiento de fármacos tiene la ventaja de aprovechar la información que ya está establecida por la farmacopea como ser la farmacocinética, la farmacodinámica, la biodisponibilidad y los efectos adversos que estas moléculas causan. De esta manera, los fármacos reposicionados exhiben tiempos de desarrollo más cortos (5-8 años) en



comparación con los asociados a nuevas entidades químicas (10-15 años) (132). En consecuencia, el reposicionamiento permite reducir los costos de desarrollo hasta un 60%. Adicionalmente, el riesgo que conllevan es menor: la tasa de aprobación de drogas reposicionadas alcanza un 30% (132).

Históricamente, el reposicionamiento de fármacos se dio de manera oportunista y fortuita; una vez que se detecta un nuevo efecto en su uso, la misma es rápidamente llevada hacia una explotación comercial. Quizás el caso más famoso de reposicionamiento lo constituye el Sildenafil. Este compuesto diseñado originalmente para el tratamiento de las anginas de pecho encontró un nuevo uso en el tratamiento de la disfunción eréctil (133). Así también la Talidomida, introducida al mercado inicialmente como un sedante y retirado por sus efectos teratogénicos, encontró utilidad años más tarde en el tratamiento del eritema nudoso leproso (ENL) (133) y del mieloma múltiple (134). El éxito relativo del desarrollo de fármacos a través del reposicionamiento impulsó a la industria farmacéutica a aplicar esta aproximación a un gran espectro de patologías, desde enfermedades raras del trópico (135) hasta las enfermedades neurodegenerativas (136, 137).

Dentro de este último grupo se está evaluando el efecto neuroprotector de la Exenatida (138, 139), un compuesto usado para el tratamiento de la diabetes, y la Isradipina, un medicamento utilizado para la presión alta (140). Por otra parte, el estudio en fase clínica de los parches de nicotina indicó que el mismo no presenta ningún beneficio para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (141) mientras que la administración de Nilotinib arrojó resultados contradictorios (142, 143).

### ***1.3.3. Tetraciclinas: una nueva opción para su reposicionamiento en el área de las enfermedades neurodegenerativas***

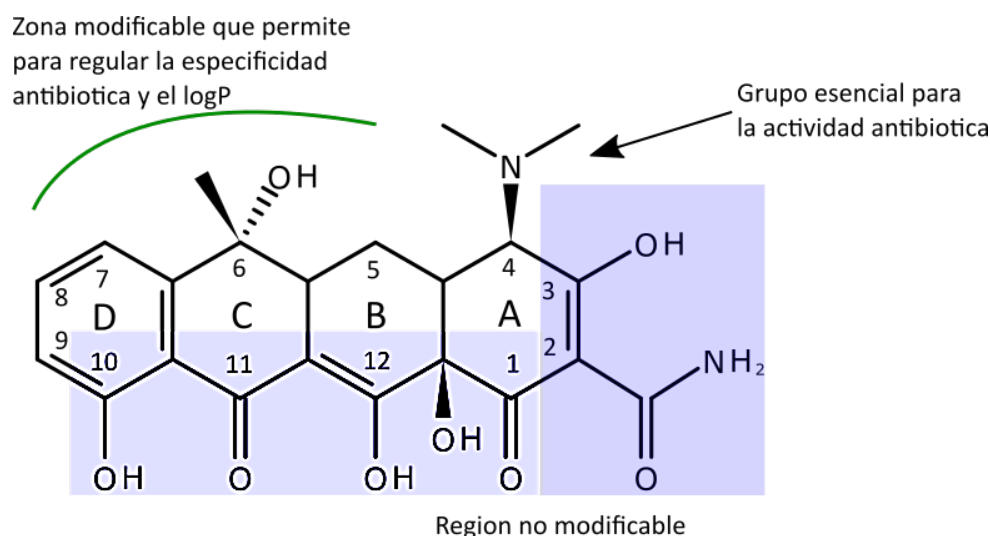
Las tetraciclinas (TCs) son moléculas versátiles para su modificación química, donde la relación estructura-función es bien conocida especialmente contra bacterias. Constituyen una clase de antibióticos capaces de inhibir la síntesis de proteínas en bacterias Gram positivas y Gram negativas al prevenir la unión del aminoacil-ARNt al sitio aceptor de los ribosomas (A) (144). Este mecanismo ha sido confirmado por cristalografía de rayos X (145). Las TCs se unen específicamente al ribosoma bacteriano y no así a los ribosomas de las células eucariotas.

Históricamente, las tetraciclinas se clasifican en primera, segunda y tercera generación (146). Las TC de primera generación corresponden a aquellas que se obtienen mediante biosíntesis como son la Tetraciclina, la Clortetraciclina, la Oxitetraciclina, la Demeclociclina. Las de segunda generación son derivados de semi-síntéticos y abarcan a la Doxyciclina, la Limiciclina, la Meclociclina, la Metaciclina, la Minociclina, y la Rolitetraciclina. Finalmente, las de tercera generación se obtienen totalmente en forma sintética, tal como la Tigeciclina. Sin embargo, algunos investigadores consideran que la Tigeciclina es distinta de otros medicamentos que contienen tetraciclinas y se consideran una nueva familia de antibacterianos llamados glicilciclinas.

Las tetraciclinas presentan una plétora de actividades biológicas además de la actividad antibiótica, como ser la capacidad de inhibir metalo proteasas de la matriz extracelular, la capacidad de secuestrar iones divalentes como calcio y magnesio, o su capacidad de secuestrar especies reactivas del oxígeno. A través de estudios de la relación estructura-actividad se pudieron comprender las bases moleculares que dictan estas diversas actividades biológicas.

Las tetraciclinas tienen una estructura relativamente rígida formada por un centro común de cuatro anillos, etiquetados A-D, al cual se adhieren distintos sustituyentes (Figura I.13.). La distribución diferencial de los sustituyentes polares y apolares permiten definir una cara con gran capacidad para formar puentes hidrogeno de un lado, y una cara con preferencia por las uniones hidrofóbicas por el otro. Así, la región rica en oxígeno del lado inferior es crítica para la unión a blancos procariotas y eucariotas, e interferir con este grupo disminuye o elimina su actividad. Esta región otorga también la capacidad para formar complejos con iones divalentes mediante el grupo ceto-enólico ubicado en posición 11 y 12. La región hidrofóbica superior es el sitio de mayor variabilidad entre las tetraciclinas y permite modular tanto la actividad antibiótica de la molécula como su coeficiente de partición en octanol-agua (146). El sustituyente dimetilamino en posición 4 es de particular importancia para la actividad antibiótica. La eliminación del mismo da lugar a las tetraciclinas modificadas químicamente o CMT (por su sigla en inglés "*Chemically Modified Tetracyclines*") las cuales no presentan actividad antibiótica pero conservan la capacidad de unirse a otros blancos moleculares como las metaloproteasas de la matriz extracelular (147). Por otra parte, la capacidad de retirar especies reactivas del oxígeno estaría mediada por los grupos ceto-enólicos 1-3 y 11-12 y por el grupo

fenólico en posición 10, los cuales reaccionarían formando radicales menos reactivos ya que se estabilizarían por resonancia (148).



**Figura I.13: Estructura química de la Tetraciclina.** Se muestran los anillos A a D y la numeración de los carbonos utilizada en la nomenclatura de las tetraciclinas para denominar la posición de los sustituyentes.

La función de las TCs en otros campos como ser la oncología, la neurología, la virología no está del todo descrita, sin embargo, están surgiendo como nuevas aplicaciones tecnológicas para estos campos de estudio. En los últimos años se comenzaron a utilizar diferentes tetraciclinas para inhibir el proceso de agregación de diferentes proteínas (149, 150) y el proceso de neuroinflamación tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (151).

Así se demostró en un modelo *in vivo* que la doxiciclina inhibe la liberación de diferentes citoquinas proinflamatorias por parte de la microglía como así también la liberación del neurotransmisor glutamato, demostrando tener propiedades antiinflamatorias. Además, mitiga la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra* y en las terminales nerviosas en el cuerpo estriado (152).

Se propuso que el mecanismo subyacente a este efecto sería la habilidad de la doxiciclina de disminuir la neuroinflamación (152). Tomando en cuenta que el tratamiento con anti-inflamatorios no probó ser suficiente para prevenir la neurodegeneración (153), se propone que la doxiciclina podría tener un blanco molecular adicional. De hecho, los reportes previos demostraron la capacidad de la doxiciclina de inhibir la formación de fibras de proteínas amiloidogénicas tales como el péptido

---

A $\beta$  (154), el péptido PrP (150), y la  $\beta$ 2-microglobulina (155). Sin embargo, no existen estudios acerca del efecto de la doxiciclina sobre la agregación de  $\alpha$ -sinucleína.

En base a los antecedentes expuestos, el presente trabajo de Tesis describe *el efecto antiagregante de la doxiciclina que, junto a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, permite postularla como una molécula neuroprotectora y así considerar su posible reposicionamiento como fármaco para el tratamiento en la enfermedad de Parkinson.*

---

## *II. Objetivos*

---

*“La mitad del trabajo científico consiste en plantearse las preguntas correctas.”*

Francis Bacon

El objetivo general de este trabajo de Tesis es caracterizar biofísica y funcionalmente el efecto que causan las tetraciclinas en el proceso de agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína para evaluar su reposicionamiento en la clínica.

En este contexto, los objetivos específicos de este trabajo involucran cuatro aspectos generales:

*1. Estudiar el efecto de la doxyciclina sobre la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína:*

- Evaluar la cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia y ausencia de la doxyciclina mediante espectroscopía de fluorescencia.
- Estudiar los cambios morfológicos y estructurales de las nuevas especies generadas por la acción de la doxyciclina mediante dispersión de rayos X a ángulos bajos, microscopía electrónica de transmisión, y espectroscopía vibracional.
- Determinar la interacción de la doxyciclina con las especies de  $\alpha$ -sinucleína en el proceso de agregación mediante resonancia magnética nuclear.
- Estudiar la toxicidad de las especies agregadas de la  $\alpha$ -sinucleína formadas en presencia y ausencia del antibiótico en la línea celular SHSY5Y.

*2. Identificar el farmacóforo responsable por la actividad anti-agregante de las tetraciclinas y buscar un análogo de doxyciclina con baja actividad antibiótica para su reposicionamiento:*

- Identificar los determinantes químicos en diferentes antibióticos capaces de interferir en la agregación de proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las tetraciclinas modificadas químicamente (CMTs) para evaluar su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

*3. Caracterizar el efecto de la CMT-3 en el proceso de la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína:*

- Evaluar la capacidad de la CMT-3 de inhibir el proceso de agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína mediante espectroscopía de fluorescencia.

- Determinar la morfolología de las especies formadas mediante distintos tipos de microscopías: microscopía confocal de barrido láser, microscopía electrónica de transmisión y de barrido, y microscopía de fuerza atómica.
- Estudiar las características estructurales de las especies formadas en presencia de la CMT-3 y comparar estas especies con las obtenidas con la doxiciclina.
- Evaluar la interacción de la CMT-3 con las diferentes especies agregadas de la  $\alpha$ -sinucleína mediante anisotropía de fluorescencia.

**4:** *Evaluar la capacidad de la CMT-3 de interaccionar y desestabilizar la estructura cuaternaria de especies fibrilares de la proteína  $\alpha$ -sinucleína*

- Estudiar la acción de la CMT-3 sobre fibras pre-formadas y determinar su capacidad de actuar como núcleos de polimerización en la cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína.
- Evaluar las diferencias morfológicas generadas con el tratamiento de la CMT-3 sobre las fibras utilizando microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica.
- Analizar el efecto de las fibras desensambladas sobre la integridad de membranas modelos.
- Evaluar el poder neuroinflamatorio de la CMT-3 en un cultivo primario de microglía.

---

# *III. Fundamentos e implementación de las técnicas experimentales*

---

*“Un experimento es una pregunta que la ciencia plantea a la Naturaleza, y una medición es el registro de la respuesta de la Naturaleza”*

Max Plank

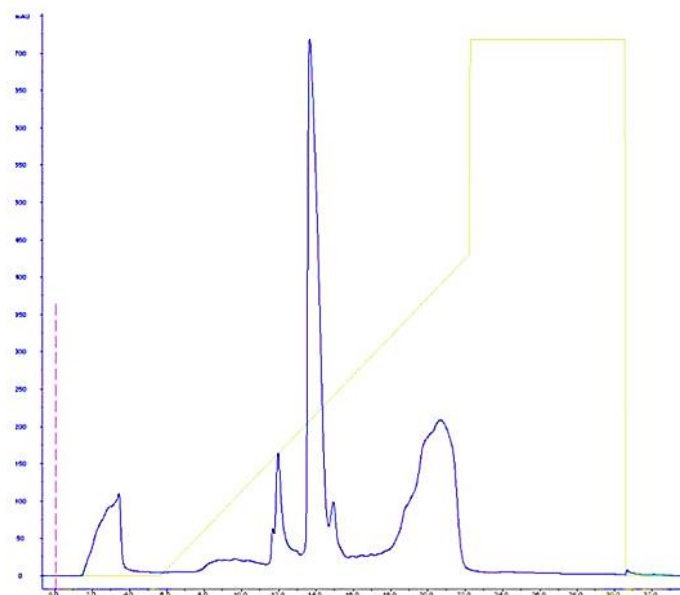


### III. 1. Expresión y purificación de la proteína $\alpha$ -sinucleína

Como parte de mi formación en este trabajo de Tesis, me entrené en la técnica de expresión y purificación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, procedimientos que llevé a cabo en el INSIBIO. La expresión de  $\alpha$ -sinucleína se realizó en *E. coli* (BL21) usando el plásmido pT7-7 que contiene el gen codificante de la proteína siguiendo el protocolo descrito por Hoyer y colaboradores (156). Las células fueron cultivadas en medio de LB en presencia de ampicilina hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento y en ese momento se indujo la expresión de  $\alpha$ -sinucleína con 0,5 mM de IPTG. Luego de 4 horas de incubación a 37°C, se cosecharon las células por centrifugación. A continuación, se reuspendieron las células en una solución tampón de lisis (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0.8-1 mM PMSF) y luego se sometieron las células a tres ciclos de disrupción mediante un microfluidificador (Microfluidizer LM20 de alta presión con celda de cerámica G10Z de 87  $\mu$ m). Explotando la termoestabilidad de la  $\alpha$ -sinucleína, se sometieron las muestras a 100 °C durante 15 minutos para producir la agregación de todas las proteínas citoplasmáticas no resistentes al calor. Luego, se eliminó el ADN celular con sulfato de estreptomicina. Posteriormente, se precipitó selectivamente la  $\alpha$ -sinucleína con 361 mg/ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se realizó una cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna Mono Q-GE acoplada a un equipo ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences) (Figura III.1).

La elución se realizó en un gradiente creciente de NaCl, en el que la proteína  $\alpha$ -sinucleína eluye aproximadamente a una concentración de 300 mM de NaCl. Luego hizo realizó una diálisis contra una solución tampón HEPES 2 mM. Por último, la proteína se liofilizó.

La pureza de la proteína se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante (SDS-PAGE) (157). La solución de  $\alpha$ -sinucleína para los ensayos de agregación se preparó en solución tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7,4. La solución obtenida antes de ser utilizada, se filtró y centrifugó 30 minutos a 12000 g para remover pequeños agregados preformados. La concentración de  $\alpha$ -sinucleína se determinó usando un coeficiente de extinción molar de 5600  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (156).



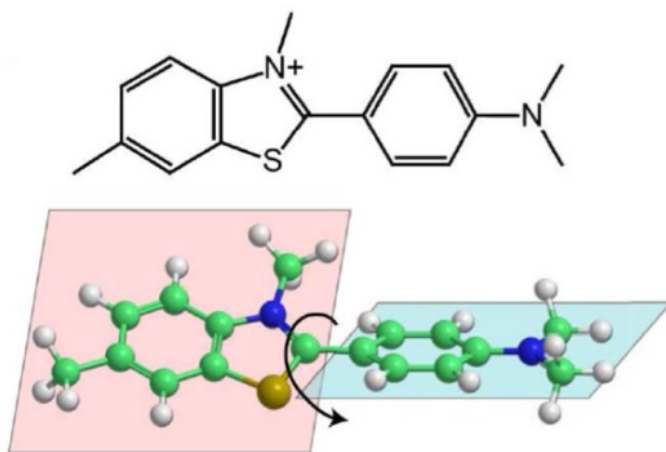
**Figura III.1. Cromatograma de la purificación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína.** Elución de la proteína realizando un gradiente de concentración de NaCl hasta un 60 % del mismo. El pico con mayor absorbancia corresponde a la proteína purificada.

#### **III.2. Espectroscopía de fluorescencia**

Una de las técnicas que utilicé durante el desarrollo de la presente Tesis para los estudios de agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína fue la espectroscopía de fluorescencia. Esta técnica es un tipo de espectroscopía electromagnética donde se utiliza un haz de luz para inducir el paso de los electrones de los fluoróforos a un estado energético excitado, los que al regresar al estado energético basal emiten luz a una mayor longitud de onda. La intensidad de emisión de la fluorescencia fue registrada en un espectrofluorómetro ISS PC1 (Urbana-Champaign, IL, USA).

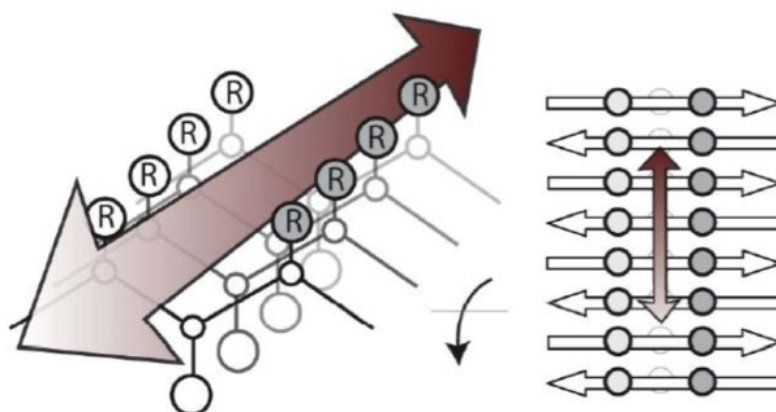
##### ***III.2.1. Estudio de los cambios conformacionales producidos durante la agregación patológica de la proteína $\alpha$ -sinucleína***

Para seguir el proceso de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína mediante espectroscopía de fluorescencia se utilizó como sonda fluorescente la Tioflavina T (ThT). Esta molécula es un benzotiazol catiónico conocido por aumentar su intensidad de la fluorescencia al interaccionar con depósitos amiloides. La sonda presenta una estructura plana con un extremo hidrofóbico formado por un grupo dimetilamino unido a un grupo fenilo (bencilamina). A su vez este grupo está unido a un grupo más polar, un grupo benzotiazólico que contiene un N y un S polar (Figura III.2).



**Figura III.2. Estructura química de la molécula de Tioflavina T (158).**

Esta combinación de regiones polares e hidrofóbicas es lo que le da la posibilidad a la molécula de ThT de formar micelas en solución acuosa, con la parte hidrofóbica al interior y los N cargados positivamente expuestos hacia el solvente (159). En solución, la bencilamina y el anillo benzotiazolico de la ThT pueden girar libremente alrededor de su enlace carbono-carbono (Figura III.3).



**Figura III.3. Sitio de unión de la ThT en las fibras amiloides.** Esquema del canal formado por las cadenas laterales de los aminoácidos que forman la estructura  $\beta$ -entrecruzada (158).

Esta rotación rápida apaga estados excitados generados por fotones de excitación, causando una baja emisión de la fluorescencia de la ThT en solución. En contraste, la inmovilización de la rotación de la ThT conserva el estado excitado, resultando en un alto rendimiento cuántico de fluorescencia (160). Se cree que al unirse a los surcos de las

fibras amiloides, ThT queda estéricamente restringida, produciéndose así un aumento de la intensidad de la fluorescencia.

Al intercalarse la ThT en las estructuras  $\beta$ -entrecruzada de las fibras amiloides, se produce un desplazamiento hipercrómico en el espectro de excitación (de 385 a 450 nm) y de emisión (de 445 a 482 nm) de la sonda. El aumento de la emisión de la fluorescencia en varios órdenes de magnitud cuando ThT se une a las fibras la convierte en una sonda eficiente y sensible para la detección de fibras amiloides, sin necesidad de lavar el exceso de ThT. (161, 162). La unión de la molécula de ThT a las fibras amiloides es muy rápida (161, 162). Los estudios de la cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia y presencia de doxiciclina o CMT-3 se realizaron midiendo la emisión de fluorescencia de la ThT a diferentes tiempos. A partir de una solución madre de 2,5 mM de ThT preparada en solución tampón HEPES 20 mM, pH 7,4 se utilizaron diferentes protocolos:

- Los estudios de dosis-respuesta de la inhibición de la formación de fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína, mediante doxiciclina y CMT-3, se realizaron incubando la proteína con diferentes concentraciones de los compuestos a 37 °C bajo agitación orbital a 600 rpm durante 96 h. Luego a cada muestra se agregó la ThT a partir de la solución madre en cantidades suficientes para obtener una concentración final de 25  $\mu$ M.
- Los estudios de la cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en ausencia o en presencia de la doxiciclina o la CMT-3 se realizaron incubando en un Thermomixer, a 37° C y bajo agitación orbital a 600 RPM, una solución monomérica de  $\alpha$ -sinucleína (70  $\mu$ M) preparada en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, en ausencia o en presencia de 100  $\mu$ M de doxiciclina o de CMT-3. Se sacaron alícuotas a diferentes tiempos de la reacción de agregación y se agregó a las alícuotas la ThT, para luego ser medidas en el espectrofluorómetro.
- Para los estudios de nucleación-polimerización también se recurrió a la espectroscopía de fluorescencia utilizando la sonda ThT. Para evaluar la capacidad de las especies agregadas de la  $\alpha$ -sinucleína de acelerar la cinética de agregación de la proteína, se incubó a 37 °C y 600 rpm la  $\alpha$ -sinucleína (70  $\mu$ M) en ausencia o en presencia de la doxiciclina durante 16 h. Luego se realizó una dilución de 1/10 de cada solución y se colocó en una solución fresca de  $\alpha$ -sinucleína (70  $\mu$ M). Se tomó alícuotas (50  $\mu$ l) a

diferentes tiempos y se agregó 70  $\mu\text{l}$  de la ThT para alcanzar una concentración final de 25  $\mu\text{M}$  para su lectura en el espectrofluorómetro.

- Para estudiar el proceso desensamblado de las fibras amiloides, se pre-incubó la  $\alpha$ -sinucleína durante 44 h bajo condiciones de agregación, previo a la adición de la doxiciclina o la CMT-3. Luego se tomó muestras a diferentes tiempos a lo largo de 48 h y se analizó nuevamente por espectroscopía de fluorescencia.

- Las especies agregadas resultantes del tratamiento con la CMT-3 y las fibras de  $\alpha$ -sinucleína fueron utilizadas como núcleos para estudiar la capacidad de ser utilizadas para el proceso nucleación-polimerización de la reacción de agregación de la proteína. Para esto, se realizó una dilución de las soluciones, se las colocó en una muestra fresca de  $\alpha$ -sinucleína fresca (70  $\mu\text{M}$ ) y se incubó las soluciones durante 120 h. Se tomó alícuotas a diferentes tiempos y cada muestra se puso en contacto con una solución de ThT. Luego se realizó las mediciones de fluorescencia como se mencionó anteriormente.

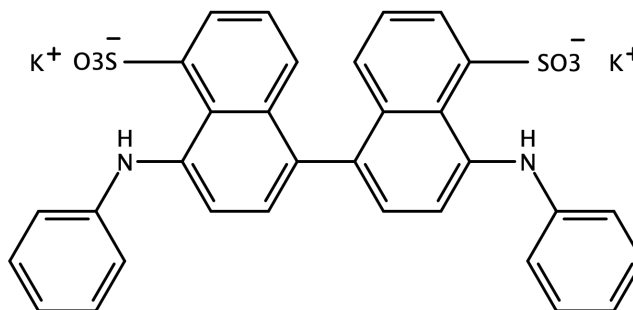
Cada punto de las diferentes curvas se realizó por triplicado y cada experimento se replicó tres veces para que los resultados obtenidos tengan validez estadística. Las lecturas de la intensidad de la fluorescencia de la sonda ThT se realizó de acuerdo a Levine y colaboradores (162) fijando la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) a 450 nm, y la de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) a 482 nm. Para esto se usó una rendija (*del inglés slit*) de 1 mm para el paso de luz de excitación y de 1 mm para el de emisión, respectivamente en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (Champaign, IL).

#### ***III.2.2. Estudio de la exposición de nuevas superficies hidrofóbicas al disolvente***

Durante el proceso de plegamiento de las proteínas ocurren diferentes cambios conformacionales y otros procesos que modifican la exposición de superficies hidrofóbicas al solvente. La exposición de superficies hidrofóbicas al disolvente también se estudió mediante espectroscopía de fluorescencia.

Los anilinaftaleno sulfonatos (ANS) son sondas esencialmente no fluorescentes en agua, y se vuelven apreciablemente fluorescentes cuando se encuentran en ambientes apolares. Esta propiedad los convierte en un indicador sensible del plegamiento de proteínas, cambios conformacionales y otros procesos que modifican la exposición de las sondas al agua. Dentro de esta familia, el cromóforo aromático 4,4'-Dianilino-1,1'-binaftil-5,5'-disulfónico (Bis-ANS) (Figura III.4.) es ampliamente utilizado para detectar

cavidades no polares en proteínas ya que tiene una mayor afinidad a regiones hidrofóbicas que otros miembros de la familia. La exposición de las superficies hidrofóbicas al solvente, inducidos por ejemplo por un cambio conformacional de la proteína, produce un aumento de la emisión de la fluorescencia. Se ha demostrado que la Bis-ANS es una sonda capaz de detectar especies oligoméricas y fibrilares de  $\alpha$ -sinucleína (163).



**Figura III.4.** Estructura química de 4,4'-Dianilino-1,1'-binaftil-5,5'-disulfónico (Bis-ANS).

Para evaluar la exposición relativa de superficies hidrofóbicas durante el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en ausencia o en presencia de distintos ligandos, se tomó alícuotas (50  $\mu$ l) de las diferentes muestras a distintos tiempos y se agregó 5  $\mu$ M de Bis-ANS en solución tampón HEPES 20 mM, NaCl 150 mM pH 7.4. La emisión de la fluorescencia fue medida en el rango de 405 a 600 nm en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (Champaign, IL) empleando una  $\lambda_{exc}$  de 395 nm. Las medidas se realizaron por duplicado y cada experimento fue replicado tres veces. Los promedios de los valores de intensidad de fluorescencia y del máximo de emisión ( $\lambda_{max}$ ) se graficó en función del tiempo.

#### **III.2.3. Estudio de la interacción de CMT-3 con la proteína $\alpha$ -sinucleína por medio de anisotropía de fluorescencia**

Otra de las técnicas con las cuales trabajé durante el desarrollo de la Tesis, fue la anisotropía de fluorescencia. Esta técnica permitió evaluar la interacción de CMT-3 con las diferentes especies de la proteína  $\alpha$ -sinucleína generadas durante el proceso de agregación.

La molécula de CMT-3 presenta una fluorescencia intrínseca caracterizada por una  $\lambda_{exc}$  a 460 nm y una  $\lambda_{em}$  a 520 nm. Por la simetría del estado basal y el estado excitado, y el tipo de transiciones que ocurren, la emisión de la fluorescencia de este compuesto ocurre en una escala de tiempo en la que se observarían fenómenos como la rotación de la molécula. Si el haz de luz se encuentra polarizado en un plano, puede cuantificarse la

intensidad de la señal emitida tanto en el mismo plano como en el plano perpendicular. En un entorno muy rígido donde la rotación de la molécula de CMT-3 esté restringida, la fluorescencia será emitida en el mismo plano en que fue excitada la molécula, dando valores de anisotropía ( $r$ ) cercanos al máximo teórico (0,4). En entornos más fluidos, en cambio, la fluorescencia será emitida con la misma probabilidad en todos los planos lo que se refleja en valores de anisotropía cercanos a cero. Las lecturas de anisotropía de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro ISS PC1 con configuración “L” con soporte para cubeta termostatzada y equipado con polarizadores tanto para el haz de excitación como para el de emisión. La anisotropía de estado estacionario ( $r_{ss}$ ) fue calculada por el *software* comercial Vinci (ISS) como:

$$r_{ss} = (IVV - g IVH) / (IVV + 2 g IVH),$$

donde  $g$  es un factor de corrección instrumental que normaliza la sensibilidad del fotomultiplicador, mientras que  $IVV$  y  $IVH$  son las intensidades de la fluorescencia registrados con el polarizador de emisión ubicado paralelo o perpendicular, respectivamente, al polarizador de excitación.

Para los ensayos de anisotropía se tomó a distintos tiempos alícuotas de 50  $\mu$ l a partir de una solución de  $\alpha$ -sinucleína incubada en condiciones de agregación. Luego a cada alícuota se le adicionó la CMT-3 y se estimó la anisotropía de fluorescencia como se describió anteriormente.

#### ***III.2.4 Estudio de la interacción de las especies agregadas de $\alpha$ -sinucleína con membranas lipídicas***

Para estudiar la capacidad de las diferentes especies agregadas de  $\alpha$ -sinucleína para desestabilizar la integridad de membranas biológicas se utilizó como sistema modelo a los liposomas (vesículas lipídicas) que en su interior encapsulan una sonda fluorescente. Cuando se produce una desestabilización en la membrana de los liposomas, se libera el compuesto fluorescente y se puede registrar un aumento cuantificable de la señal de intensidad de la fluorescencia.

Los liposomas unilamelares, es decir que están compuestos por una sola bicapa lipídica, son ampliamente utilizados como modelos de membrana por su gran versatilidad en cuanto a la composición lipídica, así también como por su homogeneidad en tamaño.

Para los estudios de permeabilidad de membranas se puede encapsular una sonda fluorescente como es la calceína. Al encontrarse en altas concentraciones en el interior del liposoma, la calceína tiene muy baja señal de fluorescencia por un fenómeno de auto-apantallamiento o auto-apagado (*del inglés, self-quenching*). Si cambia la permeabilidad del liposoma, la sonda se libera al medio y sufre un efecto de dilución con el consiguiente incremento en la señal de intensidad de la fluorescencia (164).

Para trabajar con sistemas modelos de membrana se usó mezclas de lípidos extraídos de membranas de cerebros de ratas blancas cepa Wistar, con un peso de 200 gramos provistas por el Bioterio del Instituto de Química Biológica (Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT). Las ratas fueron obtenidas por exocría y mantenidas bajo condiciones de humedad y temperatura controlada, y bajo un ciclo de 12 h luz-oscuridad. Los animales fueron cuidados y tratados de acuerdo con los criterios establecidos en la “Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio” (165). Para la extracción de los lípidos se utilizó el método de Folch (166).

Para obtener los liposomas, en un tubo de vidrio se colocó los lípidos extraídos de membranas de cerebros de rata solubilizados en una solución de cloroformo:metanol (2:1), y se los secó bajo corriente de nitrógeno. La película adherida en las paredes del tubo se hidrató con solución tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,4 con calceína 50 mM a 40°C durante 30 minutos. Hasta este punto, el proceso arroja vesículas multilamelares. Para obtener vesículas unilamelares pequeñas (SUV), se sometió la mezcla a ondas de ultrasonido en un sonicador de punta de titanio (Branson) durante 20 minutos, y usando ciclos con fases de apagado/encendido de 15 segundos de duración cada una a una temperatura de 40°C. Luego, se ecntrifugó las SUV a 10.000 g durante 10 minutos a fin de sedimentar las partículas desprendidas por la punta de titanio y las vesículas multilamelares residuales.

Para evaluar la interacción de las fibras y las fibras desensambladas con membranas lipídicas se encapsuló la sonda fluorescente calceína en liposomas compuestos por los fosfolíidos DOPC:DOPA (1:1). Se utilizó un extrusor para obtener vesículas unilamelares grandes (LUV) de 400 nm de diámetro.

Luego de preparar las diferentes vesículas se realizó una filtración en columna Sephadex G-75 (25 cm x 1 cm), equilibrada previamente con solución tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 y saturada con lípidos, para eliminar el material fluorescente no encapsulado. La concentración de vesículas eluídas de la columna se determinó mediante el método de Ames (167). Para realizar las mediciones se ajustó la concentración de



fosfolípidos en 15  $\mu\text{M}$  y se agregó 5  $\mu\text{M}$  de los diferentes oligómeros, fibras y fibras desensambladas de  $\alpha$ -sinucleína formados. Se midió la intensidad de la fluorescencia de la calceína en función del tiempo utilizando un espectrofluorómetro ISS-PC1 con agitación constante. Se fijó las longitudes de ondas de excitación a 490 nm y la de emisión a 515 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de pérdida de contenido tomando como 100 % la pérdida que produce la adición de 0,1% del detergente Tritón X-100.

El porcentaje de liberación de la sonda se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de liberación del colorante} = (\text{IF} - \text{IB}) / (\text{IT} - \text{IB}) \times 100,$$

donde IF, IT e IB son la intensidad de la fluorescencia de la sonda liberada por la proteína, la sonda total liberada y el blanco de control, respectivamente.

#### **III.3. Dispersión de la luz y turbidimetría. Estudio de agregación de la proteína $\alpha$ -sinucleína**

Para estudiar la dispersión generada por las especies de  $\alpha$ -sinucleína, en presencia y ausencia de la CMT-3 a distintos tiempos de agregación, se utilizó la técnica dispersión de la luz medida con un espectrofluorómetro y por turbidimetría.

La dispersión de la luz se basa en el efecto Tyndall, es decir, en la propiedad de las partículas con tamaño del orden de la longitud de onda de la luz de dispersar la radiación a distintos ángulos que varían en función de la concentración de la sustancia, así como de su naturaleza e interacción con el disolvente.

Para estudiar la cinética de agregación mediante la dispersión de luz con un espectrofluorómetro se extrajeron alícuotas a distintos tiempos de incubación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia y ausencia de la CMT-3. Luego, se excitó estas muestras a 300 nm y se realizó la lectura de dispersión de la luz a 600 nm ( $\lambda_{\text{em}} = 2\lambda_{\text{exc}}$ ). Las combinaciones de rendijas fueron 1/1 mm para la excitación y de 1/2 mm para la emisión. El valor de intensidad de  $t = 0$  h de incubación se sustrajo a los demás puntos de cada curva, y se graficó la intensidad resultante en función del tiempo.

Para los estudios por turbidimetría se preparó una solución de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia y en presencia de CMT-3. La absorbancia de cada solución se midió a 500 nm a diferentes tiempos utilizando un espectrofotómetro marca Beckman DU 7500.

**III.4. Espectroscopía vibracional. Estudio de los cambios conformacionales de  $\alpha$ -sinucleína inducido por la doxyciclina y la CMT-3 mediante espectroscopía de infrarrojo**

La espectroscopia de infrarrojo (IR) es una técnica que permite obtener información estructural de diferentes sistemas biológicos en solución. Durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis realicé mediciones de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) en el equipo de nuestro laboratorio para analizar los cambios conformacionales que se producen durante la agregación de la proteína en ausencia y en presencia tanto de la doxyciclina como de la CMT-3.

La espectroscopía infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran con niveles de energía discretos denominados modos normales de vibración. Las frecuencias vibracionales son determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y, eventualmente, por el acoplamiento vibrónico asociado. Para que un modo vibracional en una molécula sea activo en IR, debe estar asociado con cambios en su momento dipolar permanente. Así, las frecuencias de las vibraciones pueden ser asociadas con un tipo particular de enlace. Las biomoléculas, al ser estructuralmente complejas, poseen numerosos modos normales de vibración activos en el infrarrojo y por lo tanto su espectro es muy complejo y presenta múltiples solapamientos entre las diferentes bandas de absorción. Sin embargo, la repetición de ciertos patrones estructurales simplifica la interpretación de los mismos y posibilita la obtención de información estructural fiable. Las posiciones espectrales se expresan en números de onda,  $\nu = 1/\lambda$  (expresado en  $\text{cm}^{-1}$ ).

El estudio de los cambios conformacionales de proteínas se puede realizar por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), analizando las vibraciones que se producen en el enlace peptídico. Este presenta nueve modos normales de vibración, cuyas bandas de absorción, Amida A, Amida B y Amida I – VII, fueron nombradas siguiendo un orden decreciente de frecuencias. La banda Amida I es una banda de absorción intensa en el espectro de infrarrojo de proteínas, y se localiza entre  $1600$  y  $1700 \text{ cm}^{-1}$ . Esta banda está asociada principalmente a la vibración de tensión de los grupos  $\text{C=O}$  (70-85%) del enlace peptídico. La banda Amida I es sensible a la estructura y la dinámica conformacional de las proteínas debido a que los ángulos diedros del enlace peptídico en las diferentes estructuras secundarias afectan la longitud y la

dirección de los átomos dadores y aceptores del enlace de hidrógeno entre los grupos C=O y N-H. Esto lleva a que los enlaces de hidrógeno del enlace peptídico en las diferentes estructuras secundarias posean diferente fuerza y, por lo tanto, frecuencias de absorción típicas. De esta manera se reportaron tablas de correlación de estructuras secundarias y rangos de frecuencias en las que absorben (168, 169).

Para estudiar los cambios conformacionales de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la doxiciclina o la CMT-3, durante el proceso de agregación amiloide, se utilizó FT-IR. Se analizó muestras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína (280  $\mu$ M) en ausencia o en presencia de la doxiciclina 400  $\mu$ M en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pD 7.0 en D<sub>2</sub>O incubadas durante 0, 2 y 16 h bajo agitación orbital a 37°C. Se trabajó en medio con D<sub>2</sub>O ya que permite montar las muestras con un mayor paso óptico y en consecuencia trabajar con soluciones más diluidas de la proteína.

Dado que la cantidad de proteína monomérica es mayor a la cantidad de las especies oligoméricas en la solución, después de la incubación se separó parcialmente el monómero utilizando un filtro Amicon Ultra-0.5, 50 kDa y se montó las muestras en una celda termostatzada entre dos ventanas de CaF<sub>2</sub> y un paso óptico de 50  $\mu$ m utilizando espaciadores de PTFE. Los espectros se registraron en un espectrómetro Nicolet 5700 equipado con un detector DTGS (Thermo Nicolet, Madison, WI) (168). La cámara de muestras se purgó permanentemente con aire seco. Los espectros se generaron promediando 256 interferogramas recolectados con una resolución nominal de 2 cm<sup>-1</sup> y apodizados con una función Happ-Genzel. Los espectros de las diferentes muestras se corrigieron restando los espectros correspondientes a la solución tampón de trabajo, a la misma temperatura. La sustracción por solvente, la deconvolución, la determinación de la posición de la banda y el ajuste de la curva de la banda Amida I original se realizó como se describe en la literatura (168). El error en la determinación del análisis estructural FT-IR de la banda Amida I de diferentes ejecuciones es del 3%.

Los espectros de los oligómeros formados en presencia de la CMT-3 se tomaron y analizaron de la misma manera descripta anteriormente.

#### **III.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Estudio de la interacción de doxiciclina con proteína $\alpha$ -sinucleína**

Para el estudio de la interacción de la doxiciclina con la proteína  $\alpha$ -sinucleína utilizamos la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Este estudio se realizó

en marco de una colaboración con el Dr. Claudio Fernández y el Dr. Andrés Binolfi en el Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (CONICET).

La Resonancia Magnética Nuclear es una espectroscopía de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Todos los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Avance III de Bruker a 600 MHz utilizando una sonda de TCI de triple resonancia enfriada criogénicamente ( $^{13}\text{C}$  /  $^{15}\text{N}$ ). Los experimentos 1D  $^1\text{H}$  y 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC (banda selectiva optimizada del ángulo corto de transición) se registraron a 15°C donde las muestras estuvieron disueltas en solución tampón HEPES 20 mM a pH 7,4 en presencia de NaCl 150 mM y  $\text{D}_2\text{O}$  al 10%. Los espectros SOFAST-HMQC se adquirieron con los siguientes parámetros: 32 escaneos, 30 ms de retraso de reciclado, 1 K y 256 incrementos y SW de 16 y 26 ppm en las dimensiones  $^1\text{H}$  y  $^{15}\text{N}$ , respectivamente. Después de la adquisición, se llevó los espectros de 0 a 4 K ( $^1\text{H}$ ) y 2 K ( $^{15}\text{N}$ ), procesados con apodización de la campana sinusoidal y corrección de la línea de base. Para caracterizar la interacción entre la doxyciclina y la  $\alpha$ -sinucleína, se incubó las soluciones de la proteína monomérica (300  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) a 37 °C bajo agitación a 280 rpm usando pequeñas barras magnéticas. Se tomó muestras a diferentes tiempos 0, 8, 24 y 48 h, a las que luego se le adicionó la doxyciclina (200  $\mu\text{M}$ ) a partir de una solución madre (5 mM) recién preparada, e inmediatamente se tomó los espectros 1D- $^1\text{H}$  RMN.

En otros experimentos, las muestras de  $\alpha$ -sinucleína incubadas durante 0 h y 16 h se centrifugaron durante 1 h a 15000 rpm-4 °C para eliminar especies insolubles que podrían haberse formado en nuestras condiciones experimentales, antes de agregarle doxyciclina a cada muestra. Los espectros de RMN se registraron utilizando 8 K, un SW de 16 ppm, 512 escaneos y un retraso de reciclado de 1 segundo. Los espectros se llevaron de 0 a 32 K, se procesó con apodización de la campana sinusoidal y la corrección de la línea de base. Todos los espectros se adquirieron y procesaron usando el *software* comercial Topspin 3.2 (Bruker), y se analizaron usando Topspin (1D  $^1\text{H}$ ) y Sparky ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC).

**III.6. Dispersión de Rayos-X a ángulos bajos (SAXS). Estudio de la reacción de agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en presencia de doxiciclina**

Durante este trabajo realicé en tres oportunidades estadías en el Laboratorio Nacional de Luz Síncrotrona (LNLS, Campinas, Brasil). En este laboratorio me familiaricé con la técnica de dispersión de rayos-X a ángulos bajos (SAXS), incluyendo la preparación y el montaje de la muestra, la captura de los datos de dispersión y la integración de los mismos para obtener las curvas de Intensidad de luz dispersada en función del ángulo. Los análisis de función de distribución de a pares descriptas más adelante fueron llevadas a cabo en colaboración por el Dr. Leandro Barbosa y la Dra. Rosangela Itri.

La técnica SAXS permite determinar la estructura de proteínas y complejos de proteínas a baja resolución a partir de sus perfiles de dispersión de rayos-X mediante el empleo de una técnica de optimización basada en algoritmos de análisis matemático. De esta manera SAXS permite caracterizar la forma y la conformación de proteínas en solución hasta sus agregados macromoleculares permitiendo además analizar sistemas dinámicos que evolucionan en rangos temporales del orden de minutos. Esta técnica permite determinar la estructura de macromoléculas en su medio natural a través de parámetros como el radio de giro, la forma, el volumen, el peso molecular y el grado de hidratación.

Para el análisis de los cambios morfológicos en la  $\alpha$ -sinucleína (175  $\mu$ M) producidos por la doxiciclina se utilizó la línea SAXS1 del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotrona (LNLS, Campinas, Brasil). La longitud de onda de radiación se ajustó a 0,148 nm y se usó un detector Pilatus 300 para registrar los patrones de dispersión. La distancia entre la muestra y el detector se estableció en aproximadamente a 1 m, lo que nos permitió explorar un vector de dispersión ( $q$ ) mínimo de 0,10 nm<sup>-1</sup>. La magnitud del vector de dispersión está definida por:  $q = (4\pi / \lambda) \sin\theta$  (siendo  $2\theta$  el ángulo de dispersión). De esta forma, la distancia máxima de partículas accesible desde nuestra configuración experimental fue de alrededor de 60 nm. Las muestras se colocaron entre dos ventanas de mica y un espaciador de 1 mm, montadas en un porta-muestra colocado perpendicularmente al haz de rayos X. Las curvas obtenidas se normalizaron teniendo en cuenta la disminución de la intensidad del haz de rayos X durante el experimento. La curva de dispersión correspondiente a la solución tampón se restó de las curvas SAXS de

la muestra, teniendo en cuenta la atenuación de cada muestra. Todas las mediciones se tomaron a temperatura ambiente.

La función de distribución de distancia de pares  $p(r)$  es modelo independiente y representa la frecuencia de las distancias dentro del volumen completo de la partícula de dispersión, dando así información de la dimensión máxima de la partícula,  $D_{\max}$ , donde  $p(r)$  tiende a cero. En este trabajo, las funciones  $p(r)$  de las curvas SAXS se obtuvieron utilizando el *software* GNOM (170).

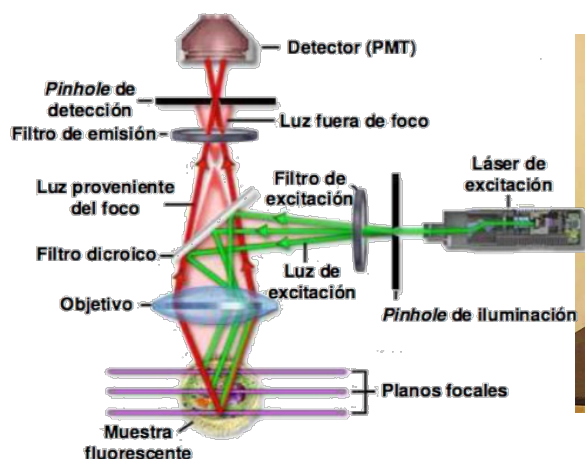
#### **III.7. Microscopías Avanzadas. Análisis morfológicos de las especies agregadas de la proteína $\alpha$ -sinucleína**

##### ***III.7.1 Microscopía confocal de barrido láser***

Además de utilizar la espectroscopía de fluorescencia para el estudio del desensamblado de las fibras de  $\alpha$ -sinucleína, analicé el proceso mediante la microscopía confocal de fluorescencia. Realicé tres cursos de formación auspiciados por el Sistema Nacional de Microscopía (SNM) que me permitieron entender los conceptos básicos del funcionamiento del equipo para programar los experimentos, adquirir los datos y analizarlos correctamente, así también como capacitarme en la operación del microscopio.

La microscopía confocal de barrido láser es una técnica de observación basada en fluorescencia y presenta numerosas ventajas respecto de la microscopía de fluorescencia convencional. Entre ellas, la habilidad de controlar la profundidad de campo, la eliminación o la reducción de la luz proveniente de regiones fuera del plano focal que proporcionan imágenes de mayor nitidez y contraste y, por sobre todo, la posibilidad de adquirir secciones ópticas de la muestra que mediante un procesamiento de imágenes se puede generar una visión tridimensional.

La microscopía confocal emplea un láser enfocado que ilumina un punto o región de la muestra a la vez. La señal emitida por la región iluminada vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través de un espejo dichroico y es enfocada en un detector (en general un fotomultiplicador –PMT– o fotodiodo de avalancha). Una pequeña apertura (del inglés *pinhole*) es colocada delante del detector para eliminar las señales procedentes de las zonas fuera del plano focal (Figura III.5). De esta manera, se obtiene una imagen de alto contraste y definición de un punto en el plano focal, sin que haya una contribución significativa de las regiones que se encuentran fuera de foco.



**Figura III.5. Microscopía confocal por barrido láser.** El principio de la microscopía confocal se ilustra en el esquema donde la luz procedente de los puntos fuera del plano focal es eliminada por el *pinhole* o abertura localizada delante del detector. Adaptado de *Fluorescence microscopy* (171). La foto muestra el microscopio confocal espectral de la firma ZEISS (modelo LMS 800) que se encuentra instalado en el IMMCA, y se usó para las mediciones en esta Tesis.

Para poder generar una imagen completa del plano, el microscopio realiza un barrido o escaneo punto a punto en el plano X-Y moviendo el láser a los distintos puntos de la muestra. En cada uno de esos puntos, el PMT detecta la fluorescencia emitida (filtrada por el *pinhole*) y le asigna una intensidad de píxel (generalmente de 8 bits = valores de 0 a 255). Utilizando la intensidad de cada píxel se reconstruye una imagen digital.

Para la detección de fibras amiloides por microscopía confocal de fluorescencia se utilizó como fluoróforo de marcación a la sonda Tioflavina S (ThS), compuesto que es un análogo de la ThT. Al igual que la ThT se une a estructuras  $\beta$ -entrecruzadas características de las fibras amiloides. Esta sonda es incapaz de unirse a hojas beta o a agregados amorfos, lo que la convierte en una herramienta muy específica para detectar agregación tipo amiloide. Para estudiar el proceso de desensamblado de las fibras mediante la tetraciclina CMT-3 por microscopía, a la  $\alpha$ -sinucleína se la incubó a 37°C con agitación. Luego de 44 h de reacción se colocó la CMT-3 (100  $\mu$ M), y se tomó alícuotas a distintos tiempos que se centrifugaron a 12.000 g durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió e incubó con 0,2 mg/ml de ThS durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación (172). Luego, el precipitado obtenido se lavó 3 veces por centrifugación y resuspendió en solución tampón fresca para remover el exceso de la ThS. Finalmente, el precipitado se resuspendió en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,4



para ser observadas en el microscopio confocal de fluorescencia entre porta y cubreobjetos. En este trabajo de Tesis se utilizó un microscopio confocal espectral de la firma *ZEISS modelo LMS 800*, el cual se encuentra instalado en el Instituto de Investigación en Medicina Molecular y Celular Aplicada (IMMCA). El microscopio está compuesto por un módulo confocal espectral, unido a un microscopio invertido Axi Observer Z1. Tiene cuatro líneas de láseres diodo de estado sólido que proveen en total de cuatro longitudes de onda de excitación: láser con sistema LED de 405, 488, 561 y 640 nm. Una unidad combinadora de láseres permite iluminar a la muestra simultáneamente con dos longitudes de onda. Consta de dos canales de detección espectral y los detectores son fotomultiplicadores de alta sensibilidad.

El sistema de detección, que se encuentra dentro de la unidad confocal, tiene un camino apocromático que asegura una transmisión mayor a 50 % entre 340 – 700 nm. Incluye un sistema de barrido lineal láser patentado por ZEISS, que consiste en dos sistemas de galvanómetros independientes para generar imágenes cuantitativas debido a su alta precisión y reproductibilidad con igual tiempo de integración en cada píxel, y mínimo tiempo de reposicionamiento del galvanómetro. La velocidad de barrido de 8 fps para 512 X 512 píxeles, sin embargo, otras velocidades y resoluciones son posibles. El tamaño máximo de la imagen es de 6000 x 6000 píxeles, ideal para muestras que tienen que ser observados con objetivos de baja magnificación. El microscopio cuenta con diversos lentes objetivos y además cuenta con una platina motorizada en X-Y que permite programar la adquisición de imágenes en el tiempo.

#### ***III.7.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de Barrido (MEB)***

Durante mi formación doctoral realicé en diferentes ocasiones estancias en el Centro de Microscopías Avanzadas (CMA), a cargo de la Dra. Lía Pietrasanta, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Dentro de las técnicas microscópicas utilizadas fue la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y de barrido Barrido (MEB). Estas técnicas son capaces de resolver detalles de estructuras a escalas micrométricas, nanométricas e incluso sub-nanométricas. Los microscopios electrónicos utilizan un haz de electrones para visualizar un objeto y operan en alto vacío por lo que lo que el material debe prepararse en forma adecuada.

En el MET se pueden observar secciones de una muestra o muestras muy delgadas en espesor (500 Å o menores), las cuales son atravesadas por un haz de electrones que pasa por un sistema de lentes electromagnéticas. La imagen generada puede ser



visualizada en una pantalla fluorescente, una placa fotográfica o una cámara digital, con altas magnificaciones. La capacidad analítica del microscopio se puede aumentar incorporando sistemas analíticos capaces de brindar información precisa sobre la composición y estructura de la muestra, la composición química y elemental, la estructura electrónica y los niveles de energía (173). En el MEB, el haz de electrones barre un área de la superficie de la muestra donde cada punto de la superficie que es impactado por el haz emite electrones secundarios, los cuales son recogidos mediante un detector apropiado y transformados en una señal electrónica que generará el contraste en una imagen.

En la Figura III.6 se muestran los equipos instalados en el Centro de Microscopías Avanzadas donde se hicieron las observaciones para esta Tesis.



**Figura III.6. Microscopios electrónicos instalados en el CMA.** El microscopio electrónico de transmisión es de la empresa Philips modelo TEM 301 cuenta con una cámara digital Mega View para el registro de los datos (izquierda). El microscopio electrónico de barrido, FEG-SEM tipo por emisión de campo, de la empresa ZEISS, modelo SUPRA 40 cuenta con distintos detectores y una configuración única de técnicas (derecha).

La preparación de las muestras para la caracterización morfológica de las especies agregadas de  $\alpha$ -sinucleína obtenidas en presencia y en ausencia de las tetraciclinas, mediante microscopía electrónica, se hizo de la siguiente manera:

- *Microscopía Electrónica de Transmisión (MET):* una alícuota de  $\alpha$ -sinucleína agregada se colocó sobre grillas de cobre de 200 mallas revestidas de carbono-Formvar (Electron Microscopy Sciences) y se agregó el reactivo UranyLess (Electron Microscopy Sciences). Se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar las muestras hasta su observación en el microscopio.

- Microscopía Electrónica de Barrido (MEB): a las grillas preparadas para observar las muestras por MET se las montó en un soporte especial diseñado en el CMA que permite observar las mismas grillas por MEB. Se trabajó a 3kV con una distancia de trabajo entre 3 y 3,8 mm y alto vacío en un microscopio.

A partir de las imágenes obtenidas para cada microscopía electrónica, en cada condición experimental, se hizo el análisis de las estructuras y mediciones.

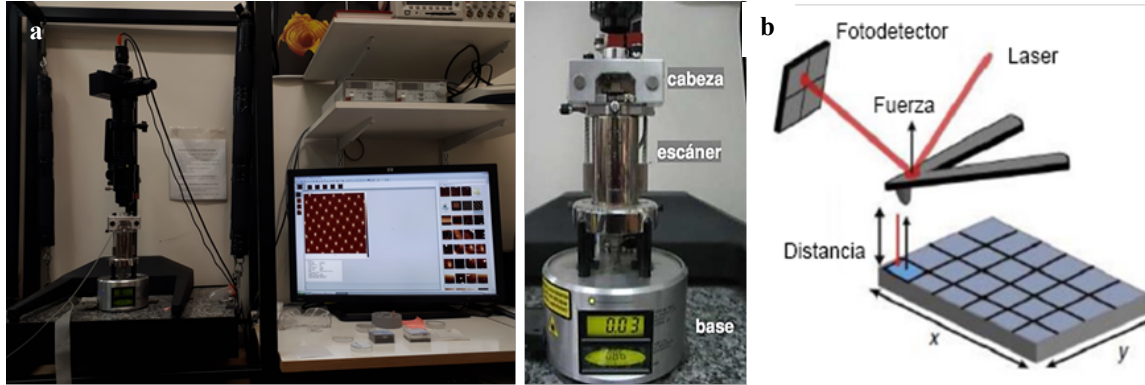
#### **III.7.3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**

Durante la estancia en el CMA me capacité en la microscopía de fuerza atómica, una herramienta para determinar no sólo topografía sino también las propiedades nanomecánicas con alta resolución espacial, temporal y la posibilidad única de detectar fuerzas en el orden de picoNewtons. En particular me compenetré en el funcionamiento del microscopio, los distintos modos de operación, la calibración de los barredores piezoeléctricos, la preparación de las muestras, la adquisición de las imágenes y el análisis de las mismas.

El principio de funcionamiento del microscopio AFM es muy simple: se basa en hacer barrer una punta extremadamente filosa sobre la superficie de la muestra siguiendo un patrón, y a una distancia de trabajo en el campo cercano (en contacto o a una distancia muy próxima). Las dimensiones usuales de esta punta son de algunos micrones de alto y menos de 10 nm de diámetro, y su ubicación en el extremo libre de un fleje o *cantilever* (del inglés) permite que pueda detectarse la deflexión del mismo durante el barrido. El resultado es una imagen tridimensional que representa la topografía de la superficie es decir un mapa de altura ( $z$ ) en función de la posición lateral ( $x$  e  $y$ ).

El microscopio consta básicamente de tres partes: cabeza, barredor piezoeléctrico o escáner, y la base (Figura III.7.a.). En la cabeza del AFM se encuentran la muestra, el sensor de fuerza (*punta propiamente dicha – fleje, del inglés tip-cantilever*), y el sistema de detección óptico. Este sistema está compuesto por un diodo láser, un espejo y un fotodetector de cuatro cuadrantes (esquema Figura III.7.b). La parte posterior del sensor de fuerza es iluminada con el láser y el reflejo del mismo en el detector de cuatro cuadrantes permite medir la deflexión (vertical o lateral) del extremo libre del fleje. El escáner o barredor piezoeléctrico permite mover la muestra colocada sobre él tanto en el

plano  $x$  e  $y$  como en  $z$ . La base sostiene al barredor y a la cabeza además de contar con la electrónica que permite operar el microscopio. Para evitar el riesgo de dañar la punta durante el barrido, un lazo de realimentación permite ajustar la distancia punta-muestra.



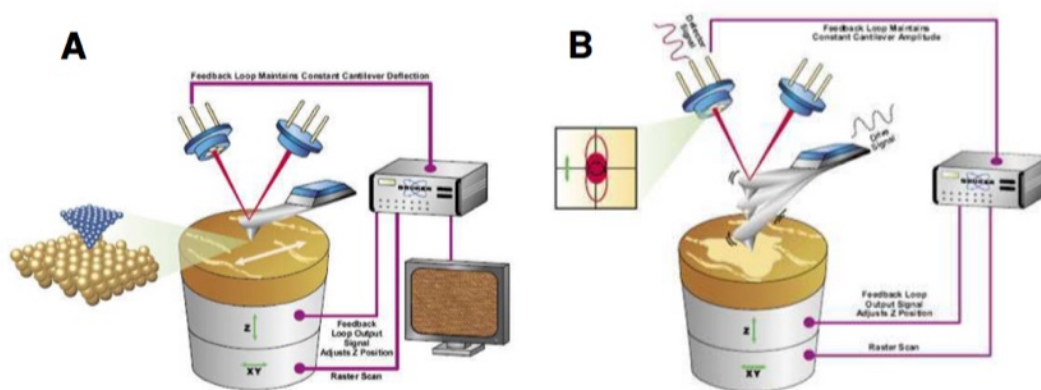
**Figura III.7. Microscopio de Fuerza Atómica instalado en el CMA.** a) Vista panorámica del equipo AFM: el microscopio está sobre una mesa anti-vibratoria, cuenta con un sistema óptico accesorio, controlador y computadora. El microscopio básicamente consta de la cabeza, el barredor piezoeléctrico y la base. b) El esquema ilustra el sistema óptico de detección y posición relativa del mismo, de la muestra y del sensor de fuerza dentro de la cabeza del AFM. El esquema fue adaptado del manual del equipo.

Existen dos modos básicos de operación para la obtención de imágenes de topografía, según se mida la deflexión estática (modo contacto) o la oscilación dinámica del *cantilever* (modo contacto intermitente) representados en la Figura III.8.

A) El modo contacto (*del inglés, Contact Mode o CM*) del AFM opera barriendo el sensor de fuerza en las direcciones  $x$  e  $y$  mientras está en contacto permanente con la muestra. Durante la medición el ciclo de retroalimentación mantiene constante la deflexión del *cantilever* ajustando la posición vertical de la muestra con el escáner. La imagen topográfica de la muestra, también llamada imagen de altura se obtiene graficando este desplazamiento vertical del escáner para cada punto  $(x, y)$ .

B) En el modo de contacto intermitente (*del inglés, Tapping Mode® o TM*) el sensor de fuerza barre la muestra oscilando a una frecuencia cercana a su frecuencia de resonancia. Cuando el sensor de fuerza se aproxima o se aleja de la superficie de la muestra, la amplitud de la oscilación cambia. Para trabajar a una amplitud constante, el escáner ajusta la altura  $z$  a través del lazo de retroalimentación, haciendo que el sensor de fuerza permanezca a una distancia fija de la muestra. Además, asociadas a este modo se pueden obtener las señales de la amplitud y de la fase de la oscilación para cada punto del barrido. Al no estar en contacto permanente con la muestra, el modo intermitente se elige

para estudiar muestras biológicas ya que el riesgo de dañar la superficie de la muestra es menor.



**Figura III.8.** Esquema de funcionamiento de los modos básicos de operación del AFM. A) Modo contacto y B) modo contacto intermitente. Tomados del manual de la empresa Bruker.

La resolución lateral en AFM está influenciada por la geometría y el radio de curvatura de la punta así también como por la topografía de la muestra; la resolución en  $z$  es mayor ya que está relacionada directamente con la gran sensibilidad de detección del método óptico, y limitada solamente por el ruido térmico.

En este trabajo Tesis se utilizó un microscopio de fuerza atómica (AFM-PF-QNM, Figura III.7.a.) de última generación y único en el país (MM8, modelo Multimode 8 de la empresa Bruker con controlador NanoScope V, Quadrex y un módulo de acceso a señales), equipado con control de temperatura y sistema de micro-inyección controlada de soluciones. El equipo no sólo permite trabajar en los modos básicos de operación sino que incorpora el mapeo cuantitativo de propiedades nanomecánicas basado en AFM (*del inglés, PF-QNM, Peak Force-QNM*). Este modo avanzado de operación de AFM permite obtener simultáneamente una imagen de topografía (información  $x$ ,  $y$ ,  $z$  en cada pixel) y una imagen de las propiedades nanomecánicas de la muestra (*adhesión, deformación, módulo de elasticidad, disipación de la energía*). En cada punto de la muestra se adquieren y analizan curvas de fuerza (deflexión del sensor de fuerza vs distancia punta-muestra) y, como ambas imágenes están correlacionadas, se generan los mapas cuantitativos de propiedades nanomecánicas con alta resolución espacial. Se eligió para las mediciones un barredor piezoeléctrico modelo J-V con aproximación automática que permite barrer un área máxima de  $120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$ , y tiene un movimiento vertical de

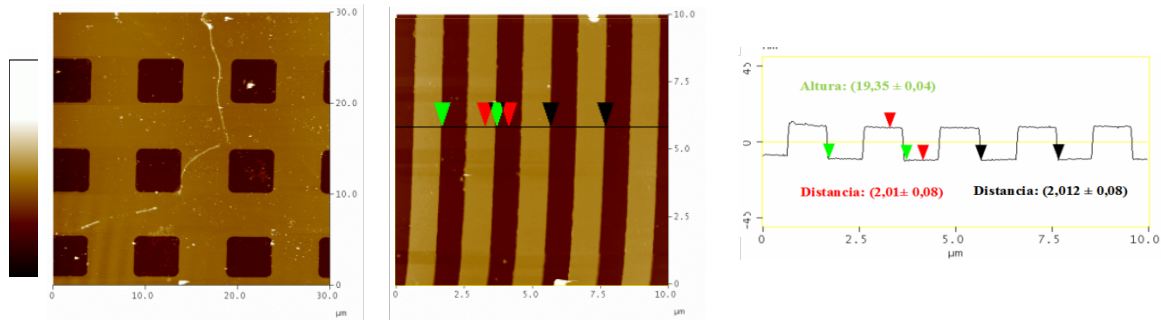
Modelo	RTESP	MSNL
Material	Silicio	Nitruro de silicio
Constante elástica (k)	40 N/m	(0.02; 0.07; 0.01; 0.03; 0.1; 0.6) N/m
Frecuencia de resonancia	300 kHz	(15; 22; 7; 15; 38; 125) kHz
Radio de curvatura	8 nm	2 nm
Longitud	125 $\mu$ m	(210; 175; 310; 225; 140; 85) $\mu$ m
Forma	Rectangular	Rectangular / triangular
Sombreado	-----	Oro
Modo de operación	TM en aire	CM en aire CM y TM en solución



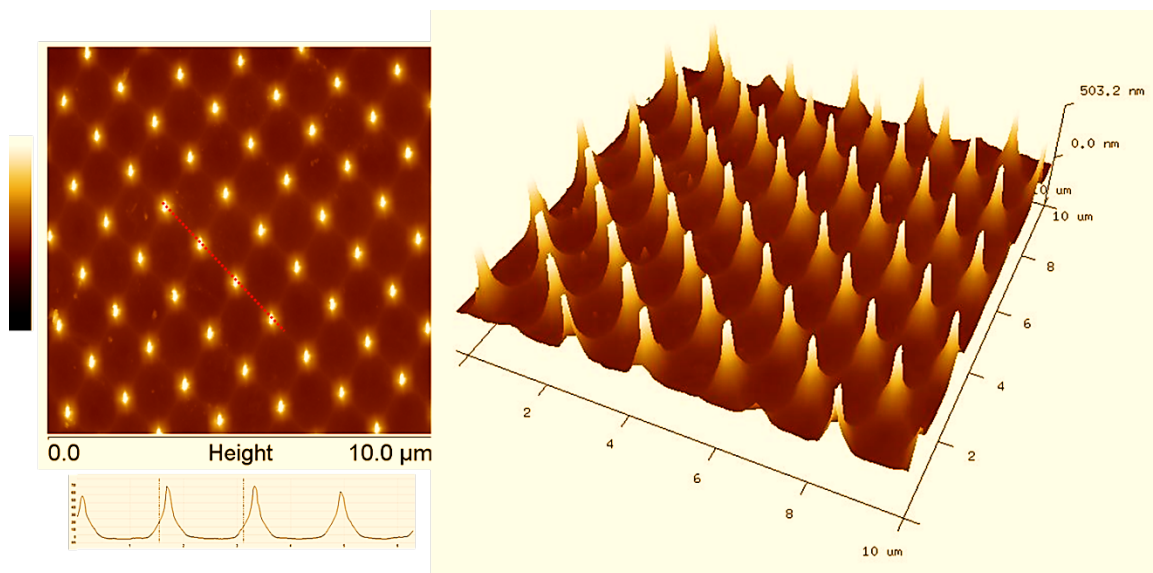
Durante la primera etapa de mi Tesis, me familiaricé con el AFM obteniendo imágenes en los diferentes modos de operación. En uno de los primeros experimentos con AFM se verificó la calibración del escáner J-V. Para este fin se utilizó una grilla de calibración comercial cuyas dimensiones ya sea en el eje vertical u horizontal se conocen con precisión. La grilla NanoGauge NGR-2 de la empresa Nanodevices (Santa Barbara, EEUU) es una grilla de calibración consiste en un arreglo de depresiones de  $(20 \pm 1)$  nm de profundidad en forma de cuadrados de vértices redondeados dispuestos con una periodicidad de  $(10.00 \pm 0.04)$   $\mu\text{m}$  en ambas direcciones laterales, y en barras con un período de  $(2.00 \pm 0.01)$   $\mu\text{m}$ . En la Figura III.10. se presenta imágenes AFM de ambos arreglos de la grilla en el modo de contacto intermitente en presencia de nitrógeno seco. Se utilizó el programa *NanoScope III 5.30r3sr3* para el procesamiento de las imágenes adquiridas. En particular las funciones de *Flatten* y *Planefit* permitieron corregir la curvatura de base que presenta la imagen, la cual se origina por el barrido y no es propia de la muestra. Para el análisis de la altura del patrón y la periodicidad se utilizó la herramienta *Section Analysis* para obtener un perfil sobre el que mediante pares de cursores de distintos colores obtenemos los valores de los parámetros deseados. Así, se trazó perfiles en dirección vertical y horizontal, en distintas regiones de la grilla, y se



promedió los valores. Los valores medidos para la altura y la periodicidad de las microestructuras se encuentran dentro del rango especificado por el fabricante.



**Figura III.10. Imágenes de AFM de la grilla de calibración NanoGauge NGR-2.** Imágenes de topografía por AFM obtenida en modo contacto intermitente para distintas regiones de la grilla: cuadrados (izquierda) y barras (derecha). Perfil de altura para la imagen de las barras del patrón obtenido luego de eliminar la curvatura de base de la imagen. Los pares de cursores de distinto color sobre el perfil indican la medición automática de altura o distancia del patrón. La barra de colores indica el rango en  $z$  de 0 a 45 nm.



**Figura III.11. Grilla de espículas TGT01 de la firma NT-MDT.** Imagen de topografía en AFM. En el panel inferior se presenta una sección horizontal mediante la que se corroboró las especificaciones del fabricante. La imagen de la derecha es una vista en perspectiva presentada con un ángulo elevación de  $30^\circ$  y una rotación de  $330^\circ$ .

Para caracterizar las puntas de los sensores de fuerza antes de cada medición se utilizó la grilla *TGT01* de la firma *NT-MDT*. Este patrón consiste en un arreglo cuadrado de espículas o puntas agudas que permite evaluar la geometría de la punta (radio de curvatura y ángulo de apertura) e identificar artefactos ocasionados por contaminación de

la punta. Están también definidas para calibración sus dimensiones laterales: distancia entre espículas ( $2.12 \pm 0.01$ )  $\mu\text{m}$ , la diagonal ( $3.0 \pm 0.1$ )  $\mu\text{m}$  y presentan un ángulo de apertura de  $10^\circ$ . En la Figura III.11. se presentan las imágenes de esta grilla por AFM, donde se puede apreciar claramente el patrón.

Para el estudio morfológico las fibras de  $\alpha$ -sinucleína las muestras se prepararon sobre mica que es un mineral en láminas que se separan mecánicamente con cinta adhesiva. De esta manera se obtiene una superficie atómicamente plana y limpia, sobre la que se colocó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de la solución de proteína. Después de la incubación durante 10 minutos, el sustrato se enjuagó con agua para eliminar la sal, se secó por soplado con  $\text{N}_2$  tipo V seco y se llevó al AFM. El modo de operación seleccionado para todas las mediciones fue el de contacto intermitente (TM-PF-AFM) en presencia de nitrógeno seco. Las imágenes adquiridas se procesaron como se describió anteriormente.

#### **III.8. Cultivos celulares**

##### ***III.8.1. Estudio de la actividad neuroprotectora de oligómeros formados de $\alpha$ -sinucleína en presencia de la doxyciclina***

Durante la realización del presente trabajo de Tesis realicé una estancia en París, Francia, en el Instituto de Cerebro y Médula Espinal (ICM) bajo la dirección de la Dra. Rita Raisman. Este tiempo en París me capacitó en el cultivo de las diferentes líneas celulares así también como en los cultivos primarios que se utilizan como modelo para el estudio de diferentes mecanismos relacionado con la EP.

Para el estudio de la actividad neuroprotectora de oligómeros formados de  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la doxyciclina se utilizó líneas celulares inmortalizadas. El cultivo celular provenientes de líneas celulares derivadas de mamíferos en un medio ambiente controlado permite trabajar de manera precisa y fina. Las células en cultivo de una línea celular, o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, superándose el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente al uso de animales de experimentación. La desventaja que presenta es que muchas de las líneas celulares son inestables luego de muchos pasajes y además no siempre pueden reemplazar el ensayo "*in vivo*", pero es una alternativa válida en muchas situaciones. En este trabajo de Tesis se utilizó la línea celular SH- SY5Y que deriva de un neuroblastoma humano y

representa un buen modelo de neuronas humanas inmaduras con capacidad de diferenciación neuronal.

Las células SH-SY5Y se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (PS), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para la viabilidad celular y el ensayo de citotoxicidad, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo y a 30.000 células/pocillo, y se mantuvieron en 100 µl de medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de PS durante 24 horas a 37°C. A continuación, las células se trataron con una alícuota de 25 µl de HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (control), o con  $\alpha$ -sinucleína 140 µM incubada durante 16 h a 37 °C bajo agitación orbital, en ausencia o en presencia de 200 µM de doxiciclina. Alternativamente, también se añadió la doxiciclina a las células y luego los oligómeros formados a las 16 h. Después del tratamiento, las células se incubaron durante 24 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Para determinar la viabilidad celular, se utilizó el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el cual permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT con la formación de un compuesto de color azul (formazán). La cantidad de este compuesto es proporcional a la cantidad de células vivas. Una vez realizado el tratamiento con las diferentes condiciones de trabajo se agregó una solución de MTT y se incubó a 37°C. El MTT se removió y se solubilizó los depósitos cristalinos en isopropanol. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. El efecto de la toxicidad se estimó en comparación con la tasa metabólica de las células control, y el efecto citotóxico como viabilidad relativa normalizada con el control. Todos los experimentos se realizaron en sextuplicado, y la viabilidad celular relativa (%) se expresó como un porcentaje relativo al control de células no tratadas. Como control de células muertas se agregó una alícuota de 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La citotoxicidad de las diferentes especies de  $\alpha$ -sinucleína se determinó utilizando el *kit* de detección de citotoxicidad (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en la medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de cultivo tras la permeabilización o lisis de las células. La enzima LDH liberada cataliza la reacción de oxidación de lactato a piruvato, reduciendo de NAD<sup>+</sup> a NADH. La formación de NADH se midió mediante una reacción acoplada en la que la sal de formazán se reduce a sal de tetrasodio, de color amarillo. La concentración del formazán solubilizado se midió espectrofotométricamente



a 490 nm. El porcentaje de citotoxicidad se refiere a la actividad de LDH liberada de las células después del tratamiento con 1% del detergente Tritón X-100.

#### ***III.8.2. Producción de cultivos primario de microglía. Estudio del efecto anti neuroinflamatorio de la tetraciclina CMT-3***

Para el estudio del efecto neuroinflamatorio de CMT-3 se implementó la purificación de cultivos primarios de microglía. Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares como por ejemplo: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide (2n), su crecimiento *in vitro* es limitado, y hay inhibición por contacto.

Para los ensayos en cultivos primarios de microglía se procedió de la siguiente manera:

- *Cuidado y manejo de los animales:* los animales fueron alojados, manejados y cuidados de acuerdo con las Directivas del Consejo de la Unión Europea (2010/63 / UE). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Animales de Experimentación de la Universidad Charles Darwin.
- *Procedimientos de recubrimiento de las placas:* cuando fue necesario, las áreas de la superficie del fondo de los recipientes de cultivo se trató con 1 mg/ml de polietileimina (PEI; masa molar promedio en peso 750,000) diluida en una solución de tampón de borato a pH 8,3 (40 mM) (174). Después de al menos 1-2 horas a 37 ° C, las placas de cultivo se lavaron 4 veces con solución tampón de fosfato de Dulbecco (PBS) antes de la aplicación del medio de cultivo y de la siembra de las células.
- *Cultivos de células microgliales:* se aislaron células microgliales del cerebro de crías de ratones recién nacidos (día 1 postnatal) mediante un procedimiento de cultivo simple que permite el aislamiento espontáneo y selectivo de estas células en gran cantidad (175). Brevemente, el aislamiento se realizó colocando en las placas recubiertos con PEI, que contenían DMEM suplementado con FCS al 10% y antibióticos, los cerebros disociadas mecánicamente en matraces Corning T-75. El segundo día se procedió a cambiar el medio para eliminar los desechos celulares, los cultivos se mantuvieron como tales durante 14-16 días más hasta que se completó el aislamiento de las células microgliales. Para producir subcultivos, se recuperó las células microgliales mediante proteólisis de tripsina usando una solución de EDTA (2 mM)-tripsina (0,05%), y se sembró en placas de 48 pocillos recubiertas con PEI a una densidad de aproximadamente

100.000 células/pocillo. Los cultivos se mantuvieron luego en medio N<sub>5</sub>, en un medio similar al líquido cefalorraquídeo (176). Este medio se complementó con suero de caballo al 5%, FCS al 0,5%, glucosa 5 mM y glicina 100 µM. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

- *Determinación de citoquinas proinflamatorias:* los medios de cultivo condicionados se recogieron al final de los períodos de tratamiento y se congelaron a -20°C. Las concentraciones de citoquinas se midieron utilizando *kits* ELISA (TNF-α e IL-1β)). La absorbancia de cada muestra se midió a 450 nm utilizando un espectrofotómetro SpectraMax M4. Las curvas ELISA estándar se generaron utilizando el *software* comercial GraphPad Prism.

- *Medición de la cantidad de glutamato liberado al medio:* los niveles de liberación de glutamato después de los tratamientos con tetraciclina y la estimulación con lipopolisacáridos (LPS) se midieron utilizando un *kit* de ensayo Amplex Red ácido glutámico/glutamato oxidasa. Se recogieron 50 µl de la solución del medio condicionado en cada pocillo y se mezclaron con 50 µl de solución tampón de la reacción que contenía Amplex Red, glutamato oxidasa, glutamato piruvato transaminasa, alanina y peroxidasa. Después de la incubación a 37 ° C, la fluorescencia de la mezcla de reacción se midió a 590 nm con un lector de microplacas de fluorescencia, luego de excitar a una longitud de onda de 555 nm.

---

# *IV. Resultados*

---

*Experimenta.*

*Falla.*

*Aprende.*

*Repite.*

En el presente trabajo de Tesis doctoral se abordó el estudio de la interacción de la proteína  $\alpha$ -sinucleína con dos tetraciclinas diferentes, la doxiciclina y la CMT-3. La interacción de estos fármacos con la proteína lleva a la formación de especies agregadas diferentes a las canónicas que fueron caracterizadas, tanto estructural como morfológicamente, mediante diferentes técnicas biofísicas y estudiadas biológicamente en diferentes modelos celulares.

Los resultados obtenidos se organizaron de la siguiente manera:

- ***1: Estudio de las propiedades neuroprotectoras de la doxiciclina***
- ***2: Búsqueda y caracterización de un análogo de la doxiciclina con baja actividad antibiótica para su reposicionamiento***
- ***3: Estudio del efecto de la CMT-3 en el proceso de la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína***
- ***4: Capacidad de la CMT-3 de interaccionar y desestabilizar la estructura cuaternaria de especies fibrilares de la proteína  $\alpha$ -sinucleína***

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan un importante avance en el estudio de los compuestos inhibidores de la agregación patológica de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, que podrían convertirse en una estrategia terapéutica atractiva contra la enfermedad de Parkinson.

#### **IV.1: Estudio de las propiedades neuroprotectoras de la doxyciclina**

Por medio de diferentes estudios se demostró que la doxyciclina es un fármaco capaz de inhibir la agregación amiloide de diversas proteínas involucradas en enfermedades neurodegenerativas (150, 154, 155). Además, evidencias *in vivo* en modelos animales de la enfermedad de Parkinson demostraron que la doxyciclina posee propiedades antiinflamatorias y es capaz de mitigar la pérdida de neuronas dopaminérgicas (151). Durante esta primera parte del presente trabajo se estudió la interacción de la doxyciclina con la proteína  $\alpha$ -sinucleína utilizando una combinación de técnicas biofísicas que nos permitieron describir una aproximación más detallada del proceso.

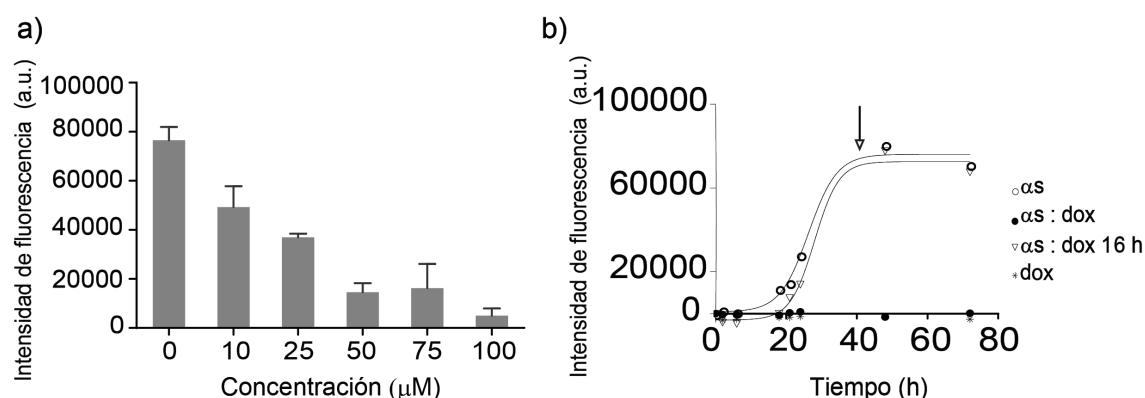
La Tioflavina T (ThT) es una sonda fluorescente capaz de interaccionar con las estructuras  $\beta$  provenientes de proteínas globulares (hoja- $\beta$ , bandas- $\beta$ , “ $\beta$ .hairpin”) y con las estructuras  $\beta$ -entrecruzadas característica de los agregados amiloides (158, 177). Sin embargo, ThT no induce ningún incremento de la intensidad al unirse a las hoja- $\beta$  de las proteínas globulares pero sí al unirse a las estructuras  $\beta$ -entrecruzadas, por lo que la convierte en un excelente marcador de los procesos de agregación amiloide (177). Utilizando los cambios de la intensidad de fluorescencia de ThT, el proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína a 70  $\mu$ M se siguió durante 96 h en presencia de diferentes concentraciones de la doxyciclina y se monitoreó la fluorescencia a 482 nm ( $\lambda_{\text{exc}}$  450 nm). La Figura IV.1.1.a. muestra que concentraciones de 100  $\mu$ M de la doxyciclina serían suficientes para inhibir la formación de agregados amiloides en nuestras condiciones experimentales.

La cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína también fue monitoreada mediante fluorescencia de ThT en ausencia y en presencia de 100  $\mu$ M de la doxyciclina (Figura IV.1.1.b.), y los resultados obtenidos son absolutamente congruentes con aquellos descritos en la literatura (178). En efecto, la agregación de la proteína mostró las tres fases del proceso de agregación amiloide claramente diferenciadas: el período de latencia que se extendió hasta las 18 h de incubación, la fase exponencial donde hay un rápido incremento de la intensidad de la fluorescencia de ThT hasta alcanzar la fase estacionaria luego de 44 h de incubación. Los datos obtenidos ajustan a una función sigmoideal que responde a la siguiente ecuación:

$$Y = I_{\min} + \frac{(I_{\max} - I_{\min})}{1 + \exp\left[\frac{V50 - X}{\text{pendiente}}\right]}$$

Donde  $I_{\min}$  e  $I_{\max}$  son las intensidades de fluorescencia mínima y máxima de la sonda, respectivamente, V50 es el valor medio de fluorescencia entre  $I_{\max}$  e  $I_{\min}$ , X corresponde al tiempo e Y a la fluorescencia experimental.

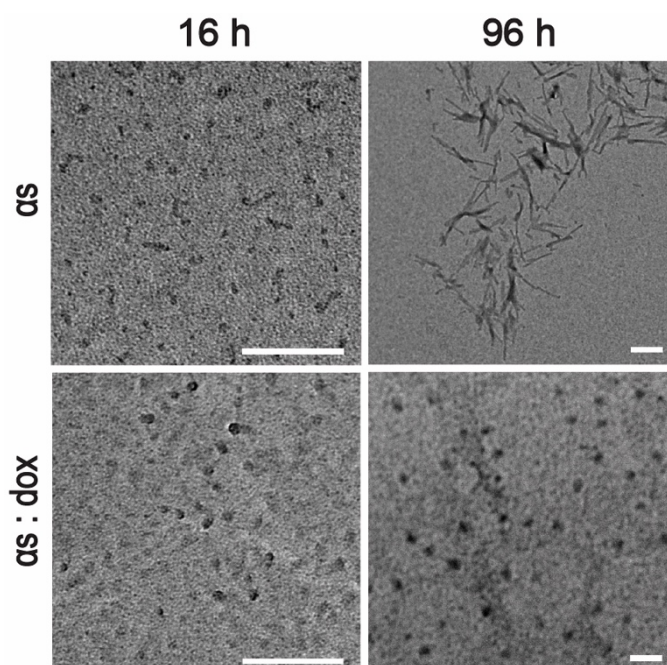
La adición de 100  $\mu\text{M}$  de la doxiciclina al comienzo de la reacción de agregación inhibe drásticamente la formación de agregados con estructura  $\beta$ -entrecruzadas. Sin embargo, si la incorporación del antibiótico se realiza una vez que se ha alcanzado la fase estacionaria no tiene ningún efecto observable en la cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína (Figura IV.1.1.b).



**Figura IV.1.1. Efectos de la doxiciclina sobre la agregación amiloide de la proteína  $\alpha$ -sinucleína.** (a) Dosis-respuesta medida luego de 96 h de incubación de la  $\alpha$ -sinucleína a 37 °C con agitación orbital en presencia de distintas concentraciones de la doxiciclina. (b) Intensidad de emisión de la fluorescencia de 25  $\mu\text{M}$  de ThT en una solución que contiene 70  $\mu\text{M}$  de la  $\alpha$ -sinucleína sola (círculo vacío), o con la adición de 100  $\mu\text{M}$  de la doxiciclina desde 0 h (círculos completos), o después de 44 h de incubación (triángulos invertidos). La adición de la doxiciclina está indicada por una flecha. Una solución que contiene 100  $\mu\text{M}$  del antibiótico solo (asterisco) también se muestra como control.

La posibilidad de que la doxiciclina inhiba todo tipo de agregación o sólo la formación de especies con estructura  $\beta$ -entrecruzadas se estudió mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En la Figura IV.1.2 se observa la  $\alpha$ -sinucleína monomérica en presencia o en ausencia de la doxiciclina a diferentes tiempos de la reacción de agregación. En las imágenes claramente se ve la presencia de especies oligoméricas a 16 h en ambas condiciones de incubación. Estas especies oligoméricas son morfológicamente indistinguibles por MET. Es importante destacar que solo en ausencia de la doxiciclina las especies oligoméricas evolucionaron a especies fibrilares que

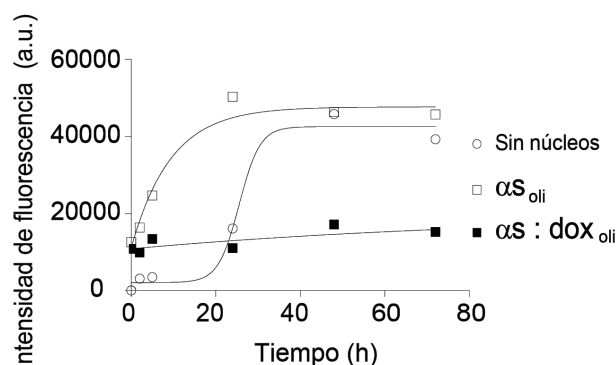
claramente se evidencian luego de 96 h de incubación. En efecto, en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de la doxiciclina, las imágenes confirman la presencia de especies oligoméricas estabilizadas que se mantienen en el tiempo. Estos resultados son consistentes con la ausencia de estructura  $\beta$ -entrecruzadas observada mediante el uso de ThT (Figura IV 1.1b).



**Figura IV.1.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET).** Muestras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la doxiciclina (abajo), y observadas a las 16 h (izquierda) o a 96 h (derecha). La barra blanca corresponde a 200 nm a 220000X y 70000X de magnificación para la comparación relativa de oligómeros y fibras, respectivamente.

Para estudiar la capacidad de las especies oligoméricas observados a las 16 h de actuar como núcleos de polimerización en el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, se incubó 70  $\mu\text{M}$  de la proteína monomérica con los oligómeros formados en ausencia y en presencia de la doxiciclina. Esta mezcla se sometió a una incubación de 72 h a 37 °C bajo agitación orbital. La Figura IV.1.3 muestra que sólo las especies formadas en ausencia de la doxiciclina son capaces de actuar como núcleos de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína. En efecto, la adición de núcleos de polimerización formados en ausencia de la doxiciclina acelera el proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína acortando la fase de latencia del proceso a valores indetectables en nuestras condiciones experimentales. Por lo contrario, los oligómeros formados en presencia de la doxiciclina no son capaces de convertirse en fibras amiloides incluso luego de cinco días de incubación (datos no mostrados). Esto

indica que las especies oligoméricas formadas en presencia y en ausencia de doxiciclina son funcionalmente diferentes y que la doxiciclina sería capaz de inducir una vía alternativa de agregación.

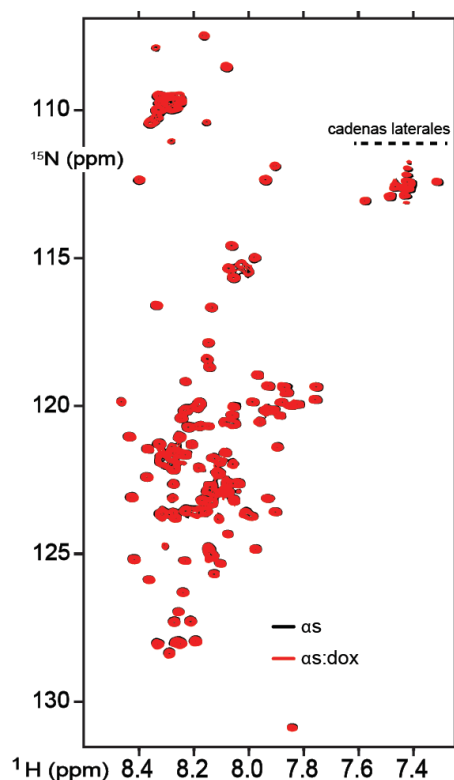


**Figura IV.1.3. Capacidad de los diferentes agregados de la proteína  $\alpha$ -sinucleína de acelerar la polimerización.** Se incubaron soluciones de la  $\alpha$ -sinucleína monomérica con oligómeros pre-incubados en ausencia (cuadrado vacío) o en presencia de la doxiciclina (cuadrado completo). Las soluciones resultantes se incubaron a 37 °C bajo agitación orbital y la agregación se midió mediante la intensidad de la emisión de la fluorescencia de la ThT. La cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína incubada en ausencia de oligómeros pre-incubados se muestra en círculo vacío.

Considerando que la  $\alpha$ -sinucleína es una proteína funcional en las neuronas, la unión de la doxiciclina al monómero funcional podría causar un efecto no deseado desde el punto de vista farmacológico. Habiendo demostrado que la doxiciclina es capaz de inducir una vía alternativa de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, surgió la necesidad de determinar a qué tipo de especies se une la molécula de tetraciclina. Para resolver este interrogante se hicieron estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) utilizando espectros de 1D  $^1H$  de la doxiciclina y espectros de correlación heteronuclear múltiple cuántica  $^1H$ - $^{15}N$  (HMQC) de la  $\alpha$ -sinucleína.

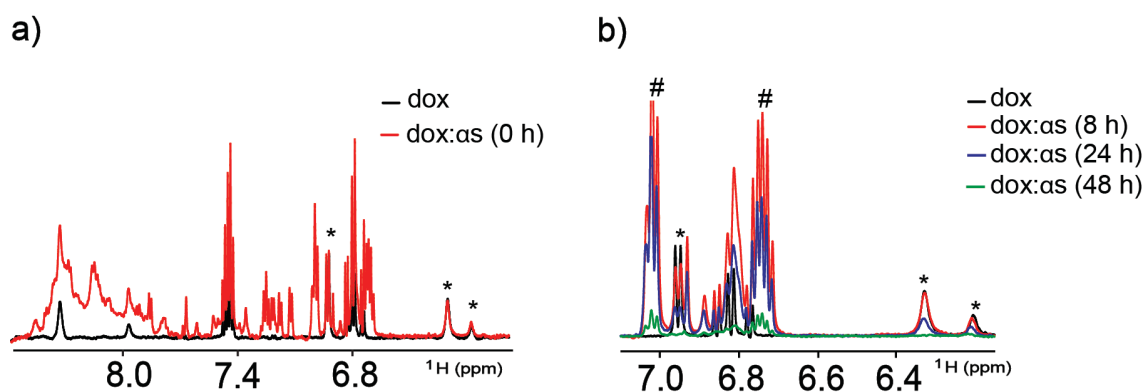
El espectro de  $^1H$ - $^{15}N$  de la  $\alpha$ -sinucleína uniformemente marcada con  $^{15}N$  se muestra en la Figura IV.1.4. Los resultados obtenidos son absolutamente comparables a los reportados en la bibliografía y muestran la naturaleza intrínsecamente desordenada de la proteína (179). Luego se realizó una titulación de la proteína con concentraciones crecientes de la doxiciclina. Los espectros  $^1H$ - $^{15}N$  HMQC obtenidos fueron superponibles a los obtenidos en ausencia de la tetraciclina, ya que no se observó ninguna perturbación en el desplazamiento químico, incluso a elevadas relaciones doxiciclina: $\alpha$ -sinucleína (5:1) (Figura IV.1.4), indicando claramente que la doxiciclina no interactúa con  $\alpha$ -sinucleína en su estado monomérico.



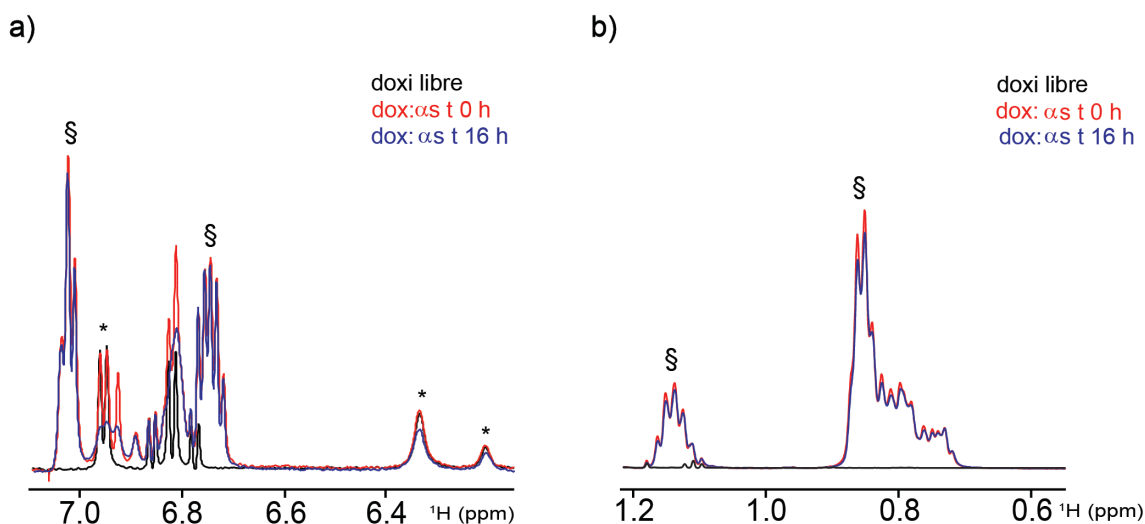


**Figura IV.1.4.** Espectros de correlación heteronuclear múltiple cuántica  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (HMQC). Diagramas de contorno superpuestos de espectros  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC de la  $\alpha$ -sinucleína monomérica 70  $\mu\text{M}$  en ausencia (negro) o presencia (rojo) de la doxiciclina 350  $\mu\text{M}$ .

Las especies oligoméricas o protofibrilares de la  $\alpha$ -sinucleína son invisibles para  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC (180, 181), por lo que no se pudo seguir el proceso de agregación mediante esta técnica. Sin embargo, el espectro 1D  $^1\text{H}$  de RMN de doxiciclina muestra resonancias bien resueltas en la región de 6.0-7.0 ppm, constituyendo una excelente estrategia para explorar la unión de la tetraciclina a la proteína durante el proceso de agregación. La adición de la  $\alpha$ -sinucleína monomérica a la doxiciclina no causó perturbaciones detectables en el espectro 1D  $^1\text{H}$  RMN de la doxiciclina, lo que confirma la falta de interacción del compuesto con la forma monomérica de la proteína (Figura IV.1.5a). Por el contrario, cuando se adicionó a la mezcla de doxiciclina especies agregadas de  $\alpha$ -sinucleína obtenidas por pre-incubación durante 8, 24 y 48 h a 37 °C, se observaron cambios en el espectro del antibiótico centrados en 6.95 ppm y 6.35 ppm (Figura IV.1.5b).



Las muestras de la  $\alpha$ -sinucleína pre-incubadas durante 8 h solo muestran pequeñas perturbaciones en la intensidad de la señal ya que la baja concentración de especies agregadas presentes en la muestra en tiempos de agregación cortos no es suficiente para inducir cambios mayores.



**Figura IV.1.6. Análisis de la unión de la doxyciclina a la proteína  $\alpha$ -sinucleína por RMN.** Espectros de 1D  $^1\text{H}$  RMN en la región aromática (a) y metílica (b) de 200  $\mu\text{M}$  de la doxyciclina sola (línea negra) y luego de la adición de 100  $\mu\text{M}$  de la  $\alpha$ -sinucleína monomérica (línea roja) o la  $\alpha$ -sinucleína que fue incubada durante 16 h (línea azul). Los asteriscos denotan señales de la doxyciclina que disminuye al unirse a los oligómeros solubles de  $\alpha$ -sinucleína. Los símbolos § indican las señales correspondientes a la  $\alpha$ -sinucleína. No se detectaron cambios importantes en las señales de la  $\alpha$ -sinucleína entre el tiempo 0 y 16 h, lo que indica que las estructuras altamente ordenadas, como fibras amiloides o protofibras grandes no se formaron en gran medida.

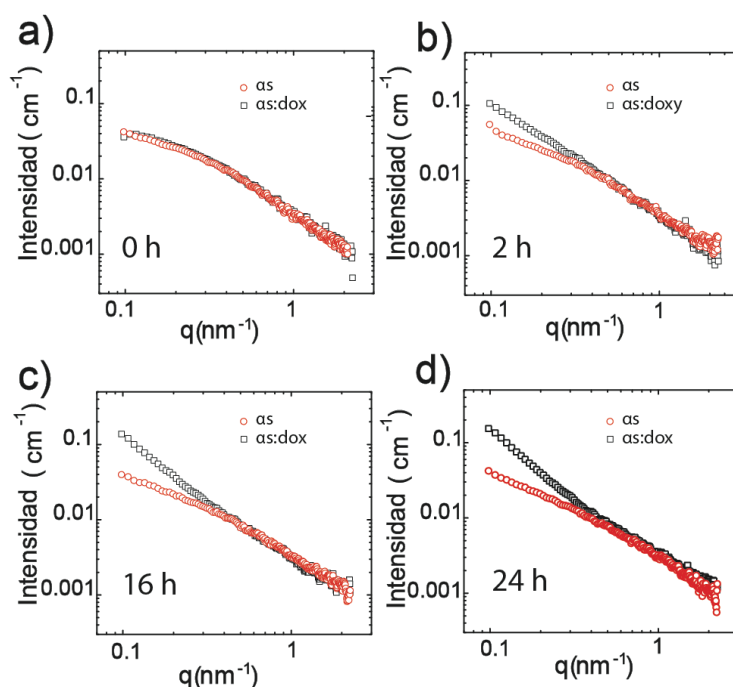
Es importante destacar que la presencia de especies agregados de gran tamaño (protofibras y fibras) producen una atenuación de la señal de la doxyciclina en el espectro 1D  $^1\text{H}$  RMN. Para analizar la interacción entre la proteína y la tetraciclina al comienzo de la fase exponencial, donde normalmente no se observan especies de gran tamaño, las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm durante 1 h antes de la obtención de los espectros (Figura IV.1.6). Esto asegura que los cambios en los espectros se deben exclusivamente a que la doxyciclina interacciona con las especies oligoméricas solubles presentes en la muestra.

Habiendo comprobado que la doxyciclina es capaz de unirse a especies oligoméricas solubles de la  $\alpha$ -sinucleína, generando oligómeros funcionalmente diferentes, se procedió a su caracterización morfológica y estructural.

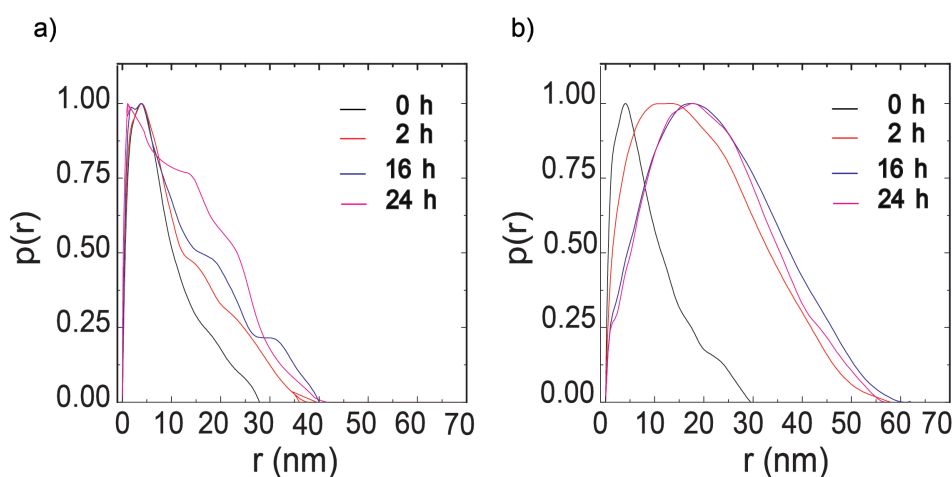
Para caracterizar morfológicamente a las especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína en la nanoescala, utilizamos la técnica de dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) para obtener parámetros relacionados a la forma y tamaño de las partículas formadas durante el proceso de agregación en presencia y ausencia de la doxyciclina. Para ello, una solución de especies monoméricas de la  $\alpha$ -sinucleína se incubó hasta 24 h a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia o en presencia de la doxyciclina. Alícuotas tomadas a diferentes tiempos fueron montadas por inyección en una celda para líquidos y se tomaron los diferentes espectros para su posterior análisis. La Figura IV.1.7 muestra la intensidad de la dispersión a diferentes valores del vector de dispersión ( $q$ ), obteniéndose una curva característica de una proteína intrínsecamente desordenada sin agregados detectables en los primeros minutos de la reacción. Luego de 2 h de incubación, SAXS define claras diferencias entre las especies oligoméricas cuando se analiza la intensidad de la dispersión de los RX a valores de  $q$  bajos (Figura IV.1.7.). Este comportamiento indica que los agregados de  $\alpha$ -sinucleína formados en presencia de la doxyciclina son más grandes respecto a los formados en su ausencia.

Los espectros de SAXS permiten además, mediante un análisis de la función de distribución de pares ( $p(r)$ ), realizar una aproximación morfológica para las diferentes muestras tomadas en el tiempo en ausencia y en presencia de la doxyciclina. La Figura IV.1.8a muestra que la frecuencia máxima de distancias ( $r_{\text{max}}$ ) dentro del agregado proteico permanece prácticamente constante en 4 nm dentro de las 24 h de agregación, mientras que la dimensión máxima ( $D_{\text{max}}$ ) se alarga de 30 nm a 40 nm, indicando la presencia de agregados elongados. Por el contrario, en presencia de la doxyciclina los

agregados formados mostraron cambios tanto en  $r_{\max}$  (hasta 22 nm) como en  $D_{\max}$  (hasta 55 nm) (Figura IV.1.8b) sugiriendo la presencia de estructuras más esféricas. Cabe destacar que pueden formarse agregados de más de 55 nm pero dicha dimensión supera el límite de detección de SAXS en nuestras condiciones experimentales.



**Figura IV.1.7. Análisis de SAXS de las especies monoméricas y oligoméricas de la proteína  $\alpha$ -sinucleína.** Curvas SAXS a partir de 175  $\mu$ M de la  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C en ausencia (símbolos rojos) o en presencia (símbolos negros) de 250  $\mu$ M de la doxiciclina a 0 h (a), 2 h (b), 16 h (c) y 24 h (d).



**Figura IV.1.8. Funciones de distribución de pares  $p(r)$ .** Curvas de  $p(r)$  en ausencia (a) o en presencia de la doxiciclina (b): 0 h (línea oscura); 2 h (línea roja), 16 h (línea azul) y 24 h (línea magenta).

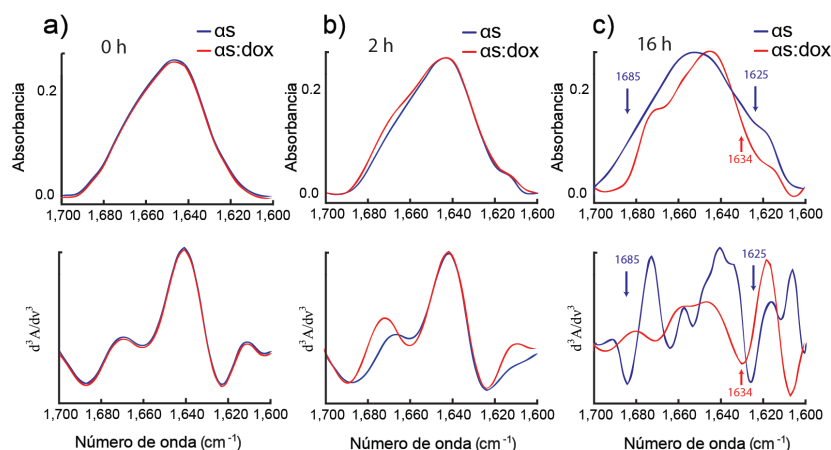
Analizando en conjunto los datos derivados del SAXS pudimos concluir que las especies oligoméricas formadas en presencia de la doxiciclina son morfológicamente diferentes a las formadas en su ausencia, ya que son esféricas y de mayor tamaño.

La caracterización estructural de especies de oligómeros de proteínas amiloidogénicas no es una tarea sencilla, ya que son especies metaestables que coexisten en un equilibrio dinámico con monómeros, dímeros u oligómeros de diferentes tamaños durante el proceso de formación de las fibras amiloides. Los métodos clásicos de alta resolución como son la Cristalografía de Rayos- X y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), presentan limitaciones en el estudio de oligómeros metaestables debido a la naturaleza dinámica de estos sistemas. Por otro lado, la espectroscopía infrarroja es particularmente sensible a las estructuras  $\beta$  (182) y puede medir las especies agregadas independientemente de la turbidez que estas causan, como así también monitorear los cambios estructurales en forma dinámica durante el proceso de agregación. Los espectros infrarrojos de las proteínas consisten en numerosas bandas de absorción relativamente intensas generadas por el enlace peptídico. Estas ventajas la convierten en una técnica muy útil para el estudio de las especies agregadas de la  $\alpha$ -sinucleína formadas en presencia y en ausencia de la doxiciclina.

El espectro infrarrojo de las proteínas está dominado por siete bandas, pero en este trabajo solo se analizó la banda Amida I, situada entre 1700 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda está formada fundamentalmente por la vibración del carbonilo del enlace peptídico, el cual posee una frecuencia característica de vibración dependiendo de la estructura secundaria o cuaternaria que estén formando. De este modo, cambios en la forma de esta banda son interpretados como cambio en la posición relativa de sus componentes.

Con el fin de realizar un análisis comparativo entre las especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína producidas en presencia y en ausencia de la doxiciclina, la proteína disuelta en medio deuterado se incubó a distintos tiempos, y alícuotas de estas reacciones de agregación fueron montadas en una celda para la colección de espectros. Al comienzo de la incubación, las bandas Amida I obtenidas a partir de las muestras de  $\alpha$ -sinucleína preparadas en presencia y en ausencia de la doxiciclina son superponibles, sugiriendo que el contenido estructural de ambas es comparable (Figura IV.1.9a). El análisis matemático de la banda Amida I se realizó mediante la sustracción de la contribución del disolvente, la deconvolución, la derivación en el espacio de Fourier y el ajuste de componentes usando el método de cuadrados mínimos. Los resultados obtenidos reflejan la

contribución porcentual de los diferentes elementos estructurales y los mismos se detallan en la Tabla II.



**Figura IV.1.9. FT-IR de la región Amida I.** Espectros de la  $\alpha$ -sinucleína (280  $\mu$ M) en solución tampón deuterada en ausencia (línea azul) o en presencia (línea roja) de 400  $\mu$ M de la doxyciclina a diferentes tiempos de incubación a 37 °C, pD 7 bajo agitación orbital: 0 h (a), 2 h (b) y 16 h (c). Los espectros deconvolucionados (arriba) se realizaron usando una forma de línea gaussiana/lorentziana mixta de 18  $\text{cm}^{-1}$  y un factor de resolución de 2. Los espectros derivados (abajo) se obtuvieron con una potencia de tres y un punto de rotura de 0.3.

La Figura IV.1.9.a muestra el espectro deconvolucionado de la banda Amida I de la  $\alpha$ -sinucleína centrado en 1.649  $\text{cm}^{-1}$ , valor característico de una proteína intrínsecamente desordenada y compatible al reportado previamente en la bibliografía (183). Durante el proceso de agregación, tanto en presencia como en ausencia de la doxyciclina, la contribución de la banda centrada a 1.641  $\text{cm}^{-1}$ , asignada a regiones con gran libertad de movimiento o desordenadas (168, 184), disminuye indicando un incremento de especies agregadas (Tabla II). El análisis del ancho de la banda Amida I a mitad de la altura máxima (HWHH) también disminuyó durante el proceso de agregación tanto en presencia como en ausencia de la doxyciclina. Este parámetro indica también un mayor grado de estructuración de las especies presente en la muestra (Figura IV.1.9 b y c). En la Figura IV.1.9b podemos observar que luego de 2 h de incubación ya se observan diferencias estructurales entre los oligómeros formados en ausencia o en presencia de la doxyciclina. Esta tendencia se acentúa con el tiempo de incubación.

Muestra	Posición de la banda (cm <sup>-1</sup> )	% Área	Asignaciones
$\alpha$ -sinucleína o $\alpha$ -sinucleína:doxiciclina (0 h)	1,625	10	Extendida
	1,642	44	Desordenada/Extendida
	1,657	27	Lazo abierto
	1,671	19	Giro- $\beta$
	1,682	<1	—
$\alpha$ -sinucleína (2 h)	1,625	13	Extendida/Hoja- $\beta$
	1,641	40	Desordenada/Extendida
	1,657	32	Lazo abierto
	1,671	11	Giro- $\beta$
	1,685	4	Hoja- $\beta$ (Componente de frecuencia alta)
$\alpha$ -sinucleína:doxiciclina (2 h)	1,629	24	Extendida/Hoja- $\beta$
	1,641	27	Desordenada/Extendida
	1,656	30	Lazo abierto
	1,671	18	Giro- $\beta$
	1,680	<1	—
$\alpha$ -sinucleína (16 h)	1,625	13	Hoja- $\beta$ antiparalela
	1,640	31	Desordenada/Extendida
	1,656	33	Lazo abierto
	1,672	19	Giro- $\beta$
	1,687	4	Hoja- $\beta$ (Componente de frecuencia alta)
$\alpha$ -sinucleína:doxiciclina (16 h)	1,619	6	Extendida/Cadenas laterales
	1,634	21	Hoja- $\beta$
	1,644	32	Desordenada/Extendida
	1,657	24	Bucle
	1,671	22	Giro- $\beta$
	1,684	<1	—

**Tabla II.** Evaluación basada en los espectros de FT-IR del contenido de la estructura secundaria durante el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en ausencia o presencia de la doxiciclina.

Para interpretar los cambios conformacionales producidos durante el proceso de agregación, se utilizó las asignaciones de frecuencia mejor descritas en la bibliografía. Por ejemplo, la banda centrada en  $1654\text{ cm}^{-1}$ , es tradicionalmente asignada a la presencia de  $\alpha$ -hélice, mientras que la ubicada en  $1638\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de hojas- $\beta$  (185). Las bandas localizadas alrededor de  $1667$  a  $1691\text{ cm}^{-1}$  se originan por los giros- $\beta$  (184, 186) mientras que la banda en  $1682\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones de alta frecuencia de las hojas  $\beta$ -anti-paralelas (184). La banda en  $1624\text{ cm}^{-1}$  es frecuentemente atribuida a estructura  $\beta$ -entrecruzada en agregados tipo amiloide (182) y constituye un excelente marcador para seguir el proceso de agregación amiloide.

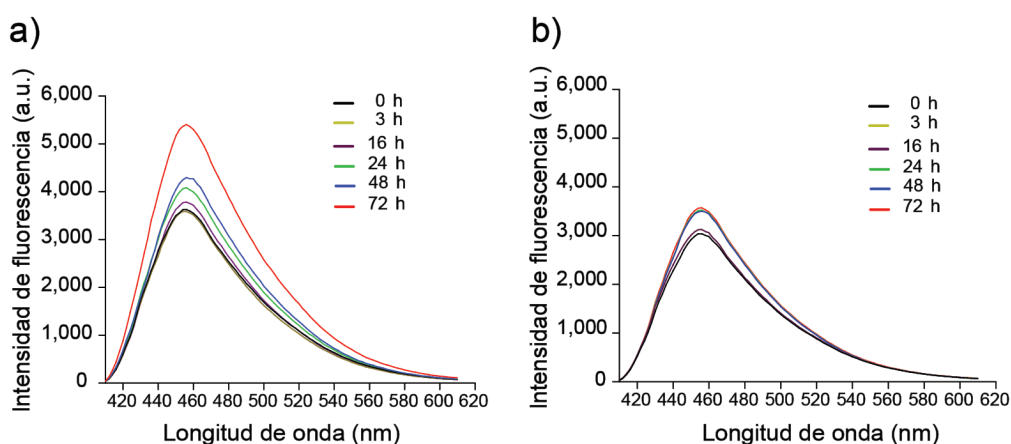
Si bien durante el proceso de agregación amiloide en ausencia y presencia de la doxiciclina aumenta el contenido de estructura  $\beta$ , la disposición de estas fue distinta y la espectroscopía infrarroja fue capaz de resolver esta diferencia estructural. De hecho, los oligómeros formados en presencia de la doxiciclina son ricos en estructura de lámina  $\beta$ -paralela inferida por la presencia de una banda a  $1.619$ - $1.634\text{ cm}^{-1}$  y la ausencia de una banda de absorción a aproximadamente  $1.685\text{ cm}^{-1}$ . Por el contrario, las estructuras de lámina  $\beta$  de los oligómeros preparados en ausencia de la doxiciclina son predominantemente anti-paralelas, como lo indica una banda en  $1,625\text{ cm}^{-1}$  con un componente de alta frecuencia centrado en  $1,685\text{ cm}^{-1}$ . Sorprendentemente, la organización diferencial de la estructura de la hoja  $\beta$  en formas paralelas o anti-paralelas se ha relacionado previamente con la citotoxicidad (23).

La sonda Bis-ANS (4,4'-Dianilin-1,1'-binaftil-5,5'-ácido disulfónico- sal potásica) es una molécula fluorescente sensible al entorno cuyo rendimiento cuántico es muy bajo en solución acuosa, pero aumenta fuertemente cuando se une a superficies hidrofóbicas. Durante el proceso de agregación amiloide se producen cambios conformacionales con exposición de residuos hidrofóbicos al disolvente que pueden ser monitoreados por una mayor captación de la sonda y, en consecuencia, un incremento en su intensidad de fluorescencia (187).

Para evaluar los cambios de hidrofobicidad en la superficie de las distintas especies de  $\alpha$ -sinucleína en presencia y en ausencia de la doxiciclina, se estudió el espectro de emisión de Bis-ANS durante el proceso de agregación. Los espectros obtenidos revelan un aumento constante de la intensidad de fluorescencia medida a  $450\text{ nm}$  en ausencia de la tetraciclina (Figura IV.1.10a). El área bajo la curva permitió estimar



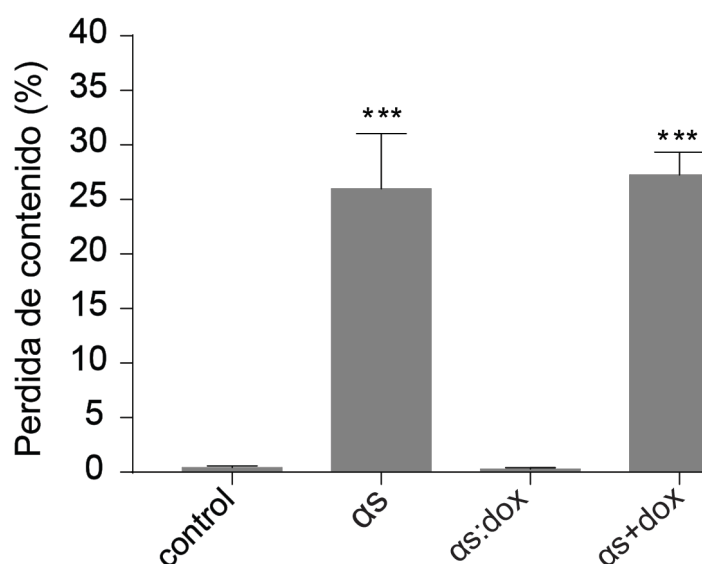
el rendimiento cuántico de la sonda que demostró un incremento del 65%. Por el contrario, las especies obtenidas durante la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la doxiciclina no generaron cambios significativos en la intensidad de fluorescencia del Bis-ANS durante las primeras 16 h (Figura IV.1.10b), y sólo alcanzó un aumento del 10% de la fluorescencia entre las 24 y las 72 horas. Estos datos indicarían que los oligómeros formados en presencia de la doxiciclina presentan menor cantidad de regiones hidrofóbicas expuestas al disolvente. Esto puede deberse a un cambio conformacional de la  $\alpha$ -sinucleína o a un bloqueo de las superficies hidrofóbicas por parte de la doxiciclina. Sin embargo, lo más probable es que podría deberse a un cambio conformacional de la proteína teniendo en cuenta los datos presentados mediante espectroscopía infrarroja. El hecho de que los oligómeros formados en presencia de la doxiciclina tendrían menor cantidad de superficies hidrofóbicas expuestas les conferirían una menor capacidad de interaccionar con membranas biológicas, así como de interaccionar entre ellos para favorecer el crecimiento de especies fibrilares.



**Figura IV.1.10. Espectro de emisión de Bis-ANS durante el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína.** Señal de fluorescencia Bis-ANS de la solución de la  $\alpha$ -sinucleína (70  $\mu$ M) incubada a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (a) o en presencia de una solución 100  $\mu$ M de la doxiciclina (b).

Como se mencionó previamente, la citotoxicidad de la  $\alpha$ -sinucleína ha sido principalmente atribuida a las especies pre-fibrilares transitorias y solubles formadas durante el proceso de agregación, debido a una hidrofobicidad de superficie suficiente como para interaccionar con membranas biológicas (43). La diferente hidrofobicidad superficial de las especies oligoméricas detectadas mediante Bis-ANS se testó funcionalmente mediante un ensayo clásico de alteración de la permeabilidad de vesículas lipídicas artificiales. Las vesículas lipídicas se prepararon con lípidos extraídos de cerebros de ratas y se encapsuló en ellas 50 mM de calceína. La calceína es un colorante

fluorescente hidrofílico que se utiliza como indicador de integridad de vesículas: ante un cambio de permeabilidad, se libera al medio y aumenta exponencialmente la intensidad de su fluorescencia al liberarse de su auto-apantallamiento. Especies oligoméricas de la  $\alpha$ -sinucleína cosechadas luego de 16 h de incubación produjeron la liberación de la sonda fluorescente de los liposomas, confirmando la capacidad de estas especies de alterar la integridad de las membranas. En cambio, especies producidas en presencia de la doxiciclina no fueron capaces de alterar la permeabilidad de las membranas sugiriendo que podrían tener un menor efecto citotóxico al actuar sobre membranas biológicas (Fig. IV.1.11). Por otro lado, la adición de doxiciclina a los liposomas no impidió la liberación de la calceína inducida por oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína cosechadas luego de 16 h, lo que demuestra que el antibiótico no estabiliza la membrana mediante una interacción directa ni bloquea el efecto perjudicial de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína producidos durante 16 h.

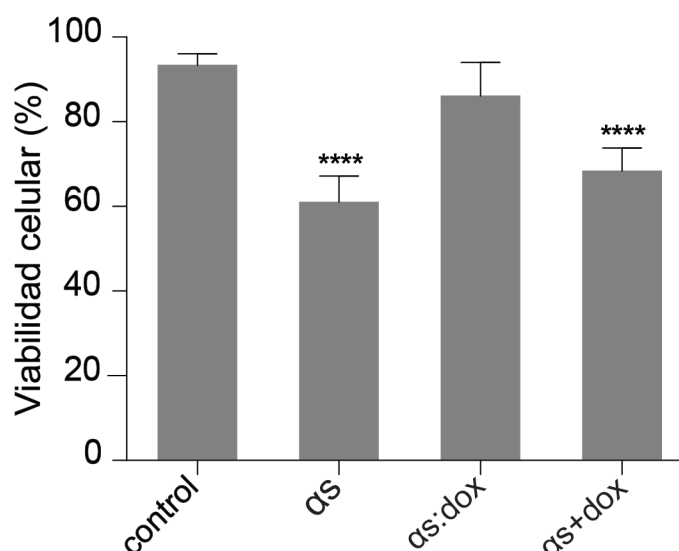


**Figura IV.1.11. Cambios en la permeabilidad de vesículas lipídicas.** Se prepararon oligómeros de la  $\alpha$ -sinucleína incubando la proteína 140  $\mu M$  en ausencia, o en presencia de 200  $\mu M$  de la doxiciclina, respectivamente, durante 16 h bajo agitación orbital a 37 °C. Además, se adicionó la doxiciclina a la mezcla de liposomas y luego se evaluó el efecto de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína sobre las membranas. La señal de fluorescencia se normalizó mediante la señal observada después de la adición del detergente Tritón X-100, que indujo la disrupción completa de las vesículas. También se usó una solución monomérica de  $\alpha$ -sinucleína como control negativo.

Trasladando este concepto a un lenguaje celular, los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína producidos en presencia de la doxiciclina deberían ser menos tóxicos respecto a los canónicos. Para testear esta hipótesis se trabajó con la línea celular SH-SY5Y que deriva de un neuroblastoma humano y representa un modelo de células dopaminérgicas. Como biomarcadores se usaron la liberación y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, y

la metabolización del compuesto Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT). La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir dicho compuesto a formazán, después de la exposición de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína en presencia y en ausencia de la doxyciclina, permitió obtener información sobre la toxicidad de estas especies.

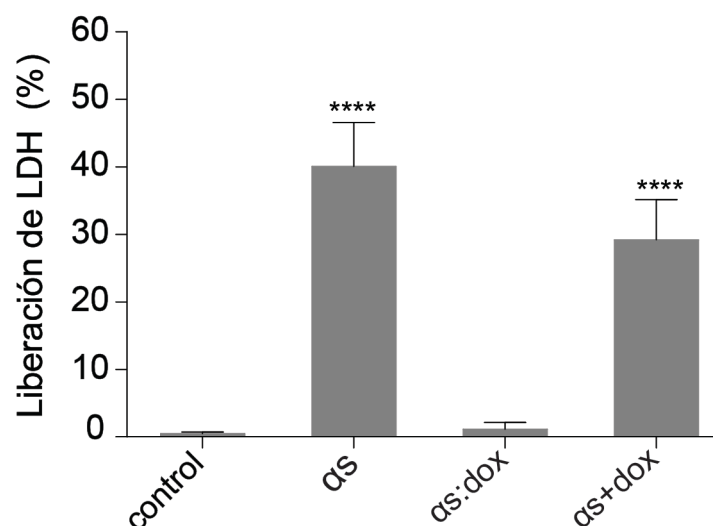
En la Figura IV.1.12 se puede observar que las células tratadas con los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia de la doxyciclina presentan una disminución significativa de su viabilidad, sin embargo, cuando se tratan células con oligómeros producidos en presencia de la tetraciclina no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto a los controles sin tratar. Es importante además destacar que la presencia de la doxyciclina en el medio de cultivo no fue capaz de prevenir el efecto nocivo que ejercen los oligómeros formados en ausencia de la doxyciclina en las células SH-SY5Y.



**Figura IV.1.12. Efecto de los diferentes oligómeros sobre células de neuroblastoma SH-SY5Y.** Viabilidad celular de las células SH-SY5Y 24 h después de la adición de HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM (control), oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína formados en ausencia y en presencia de la doxyciclina, y oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína adicionando la doxyciclina al medio cultivo. También se usó una solución monomérica de la  $\alpha$ -sinucleína como control negativo (dato no mostrado).

Para corroborar que la doxyciclina inhibe la toxicidad celular inducida por oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, se estudió la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) de las células SH-SY5Y al medio de cultivo (Figura IV.1.13). Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera al

medio de cultivo al permeabilizarse la membrana de las células que hayan sido afectadas por un agente tóxico. El incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas. El incremento en la actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo está directamente relacionado con la cantidad de formazán formado (color rojo). Por lo tanto, la cantidad de color desarrollado en el ensayo es proporcional al número de células lisadas.



**Figura IV.1.13. Efecto de los diferentes oligómeros sobre células de neuroblastoma SH-SY5Y.** Liberación de LDH al medio celular después de la adición de HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM (control), oligómeros de la  $\alpha$ -sinucleína formados en ausencia y en presencia de la doxyciclina, y oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína adicionando la doxyciclina al medio. También se usó una solución monomérica de  $\alpha$ -sinucleína como control negativo (dato no mostrado).

La Figura IV.1.13 demuestra que sólo los oligómeros formados en ausencia de la doxyciclina son citotóxicos sobre las células SH-SY5Y ya que se observó un aumento del 40% en la liberación de LDH al medio de cultivo. Por el contrario, los oligómeros preparados en presencia de la doxyciclina no produjeron una liberación significativa de LDH al medio. La adición de la doxyciclina al medio de cultivo antes de la adición de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína no fue capaz de preservar la integridad celular.

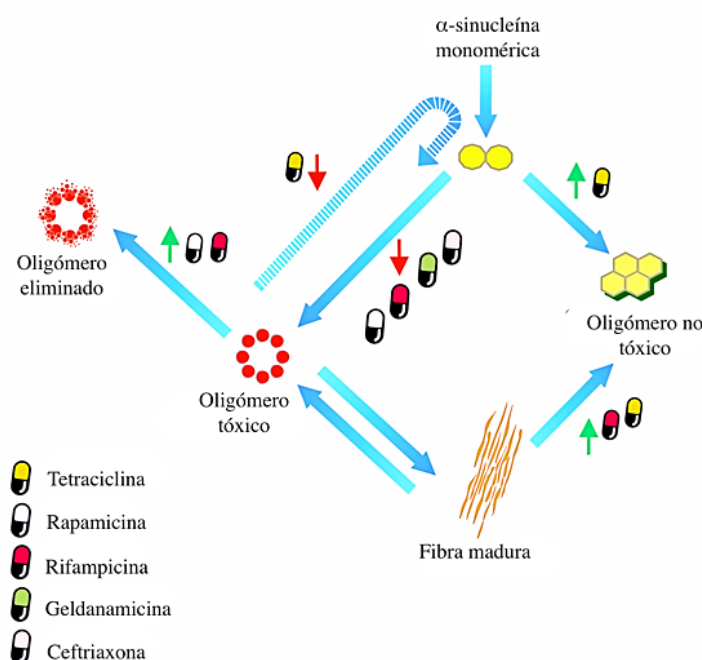
### IV.2: Búsqueda y caracterización de un análogo de doxiciclina con baja actividad antibiótica para su reposicionamiento

La capacidad de la doxiciclina de remodelar especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína hacia especies de menor toxicidad, sumado al conocimiento sobre su uso clínico, su bioseguridad, su biodisponibilidad en el sistema nervioso central (SNC), sus propiedades anti-neuroinflamatorias y antioxidantes, la convierten en una molécula muy adecuada para ser reposicionada en sinucleinopatías como la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la actividad antibiótica de la doxiciclina representa un obstáculo para tratamientos a largo plazo, como aquellos requeridos para definir a un neuroprotector. Por este motivo, se buscó un análogo estructural de la doxiciclina capaz de interactuar con las estructuras amiloideas y pre-amiloideas con la consiguiente disminución de su toxicidad, pero que posea además reducida actividad antibiótica. Para ello, se realizó una búsqueda exhaustiva en la bibliografía entre las diferentes familias de todos aquellos compuestos antimicrobianos de uso clínico capaces de interferir con el proceso de agregación de diferentes proteínas relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington, entre otras. La Tabla III resume la información recopilada.

Antibiótico	Enfermedad de Alzheimer	Enfermedad de Parkinson	Enfermedad relacionada PrP	Referencias	Ensayos Clínicos
<b>Tetraciclinas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe la formación de agregados amiloide de A<math>\beta</math></li> <li>Conduce a la formación de agregados amorfo no tóxicos</li> <li>Reduce la formación de agregados de tau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bloquea la reacción de agregación fibrillar de <math>\alpha</math>-synuclein</li> <li>Conduce a la formación de agregados amorfo no tóxicos</li> <li>Bloquea el efecto seeding en la reacción de <math>\alpha</math>-synuclein nativa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe la conversión de PrP<sup>C</sup> a la forma patológica PrP<sup>Sc</sup></li> <li>Desensambla agregados de PrP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>AD: Diomedea et al. 2010; Forloni et al. 2001; Airolidi et al. 2011; Costa et al. 2011</li> <li>PD: González-Lizárraga et al. 2017; Ono and Yamada 2006</li> <li>PrP-rD: Forloni et al. 2002; Forloni et al. 2013; Tagliavini et al. 2000</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NCT00715858; NCT00692588; NCT00439166; NCT00355576; NCT00063193; NCT01463384; NCT00029874; NCT00047723; NCT00277355; EudraCT 2006-001858-27 / 2007-005553-34</li> </ul>
<b>Gramicidina S</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bloquea la vía de agregación de A<math>\beta</math> <i>in vitro</i></li> <li>Desensambla las fibras amiloides pre-formadas de A<math>\beta</math></li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Luo et al. 2013</li> </ul>	
<b>D-Cicloserina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminuye la formación de fibras de A<math>\beta</math>-42</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Chaturvedi et al. 2015</li> </ul>	
<b>Amfotericina B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminuye la formación de fibras de A<math>\beta</math>-42</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe la conversión de PrP<sup>C</sup> a la forma patológica PrP<sup>Sc</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PrP-rD: Xi et al. 1992; Mangé et al. 2000ab; Cronier et al. 2007; Soler et al. 2008</li> </ul>	
<b>Doxiciclina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desacelera el proceso de fibrilación A<math>\beta</math></li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe la formación amiloide de PrP</li> <li>Disminuye la infectividad de PrP<sup>Sc</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>AD: Merlini et al. 1995</li> <li>PrP-rD: Tagliavini et al. 1997; Forloni et al. 2009; Corato et al. 2009</li> </ul>	
<b>Anisomicina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aumenta el nivel de tau hiperfosforilada propensa a la agregación</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>Wang et al. 2008</li> </ul>	
<b>Rifampicina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe el proceso de agregación <i>in vitro</i> de A<math>\beta</math>1-40</li> <li>Decrece la acumulación de oligómeros de A<math>\beta</math> y tau y reduce la hiperfosforilación de tau</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe el proceso de agregación de <math>\alpha</math>-synuclein.</li> <li>Desensambla las fibras amiloides pre-formadas de <math>\alpha</math>-synuclein.</li> <li>Promueve la eliminación de <math>\alpha</math>-sinucleína mal plegada a través de GRP78</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>AD: Tomiyama et al. 1994; Tomiyama et al. 1996; Tomiyama et al. 1997; Umeda et al. 2016</li> <li>PD: Li et al. 2004; Xu et al. 2007; Jing et al. 2014</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NCT00715858; NCT00439166; NCT01002079; NCT00692588</li> </ul>
<b>Geldanamicina</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminuye el nivel de agregación de <math>\alpha</math>-sinucleína a través de la regulación de la chaperona Hsp70</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Auluck et al. 2002; McLean et al. 2004</li> </ul>	
<b>Ceftriaxona</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe el proceso de agregación de <math>\alpha</math>-synuclein.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Ruzza et al. 2014</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NCT00349622; NCT00718393</li> </ul>
<b>Rapamicina</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminuye la agregación de <math>\alpha</math>-sinucleína</li> <li>Mejora la eliminación de oligómeros mediante un aumento de la autofagia</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Liu et al. 2013</li> </ul>	

**Tabla III: Efecto de diferentes antibióticos en la formación de agregados amiloides de distintas proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas.**

Como se puede observar en la Tabla III diferentes antibióticos actúan en el proceso de formación de oligómeros y fibras de la  $\alpha$ -sinucleína. Estos antibióticos también actúan disminuyendo la toxicidad de las especies amiloides formadas, en el desensamblado de las fibras amiloides y en el proceso de nucleación-polimerización. En la Figura IV.2.1 podemos visualizar en qué etapa de la reacción de agregación de  $\alpha$ -sinucleína intervienen los diferentes antibióticos.

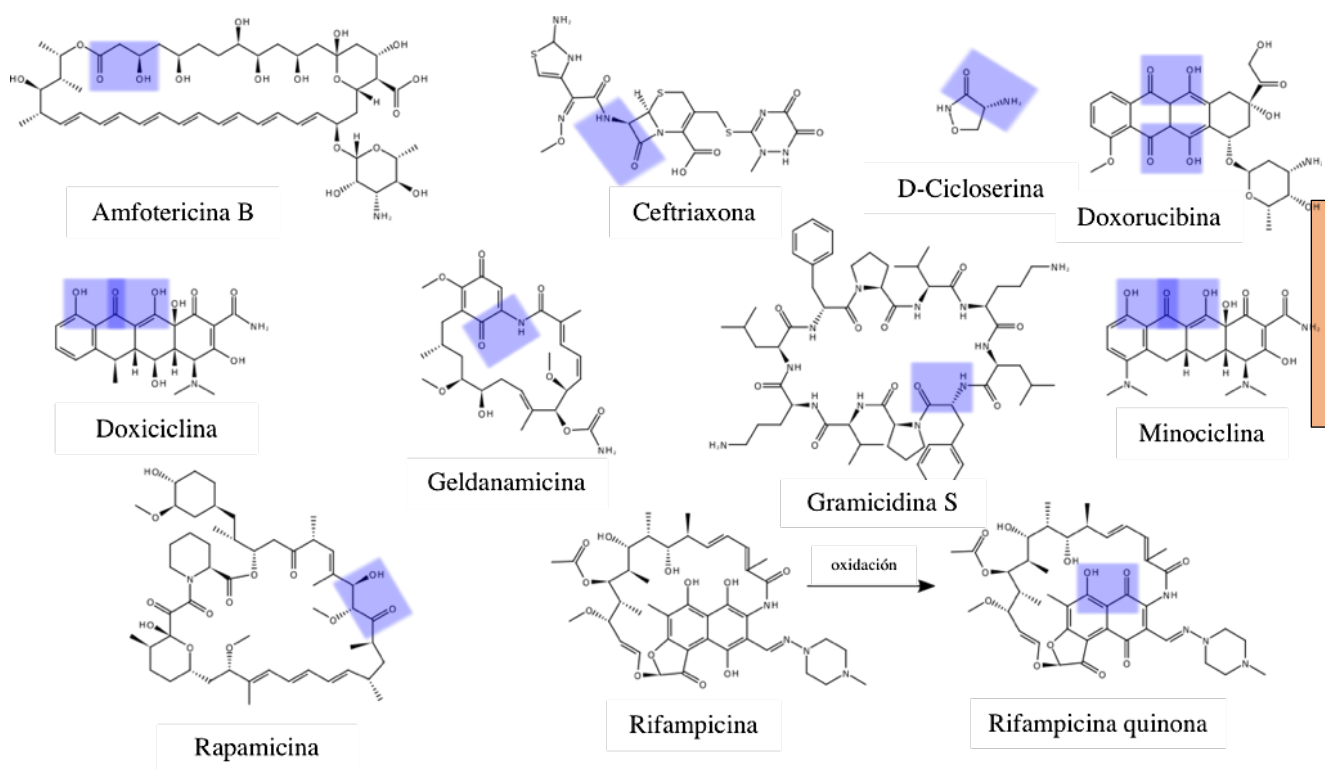


**Figura IV.2.1: Efectos de los antibióticos en la vía de agregación amiloide de la proteína  $\alpha$ -sinucleína asociada a la enfermedad de Parkinson.**

De acuerdo con la Figura IV.2.1, la Tetraciclina, la Rapamicina, la Rifampicina, la Geldanamicina y la Ceftriaxona son capaces de actuar a diferentes niveles en el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína. Por ejemplo, la Tetraciclina inhibe la formación de oligómeros tóxicos, inhibe la capacidad de utilizar los oligómeros formados como núcleos de polimerización, y ayuda al desensamblado de las fibras maduras.

Teniendo en cuenta esto, surgió la necesidad de identificar los determinantes químicos de los antibióticos que podrían interaccionar con las estructuras proteicas agregadas. Para esta búsqueda se utilizó el algoritmo de estructura máxima común (MCS), que permite identificar la máxima subestructura común a todas las moléculas que posean una determinada propiedad funcional. Se consideró como entrada para el algoritmo MCS a los antibióticos que tienen efecto sobre las diferentes proteínas que al agregarse producen estados patológicos. Para la búsqueda de MCS se realizó una comparación por pares de las estructuras enumeradas con la caja de herramientas de

similitud en la plataforma online ChemMine (188). Sorprendentemente, todas las estructuras analizadas contienen el motivo  $\text{O}=\text{CCCOH}$  o  $\text{O}=\text{CCNH}$  (marcado con color azul en la Figura IV.2.2.). Este motivo estructural constituye una disposición de par donante/aceptor de protones unido a un anillo plano cerrado y dispuesto en una configuración casi plana a una distancia promedio de 2.6 Å. Esta disposición es reminiscente a la adoptada por los grupos amino y carbonilo de la cadena principal en la estructura  $\beta$ -entrecruzada. De acuerdo a esto el motivo  $\text{O}=\text{CCCOH}$  o  $\text{O}=\text{CCNH}$  puede competir por los puentes hidrógenos de la estructura  $\beta$ -entrecruzada.



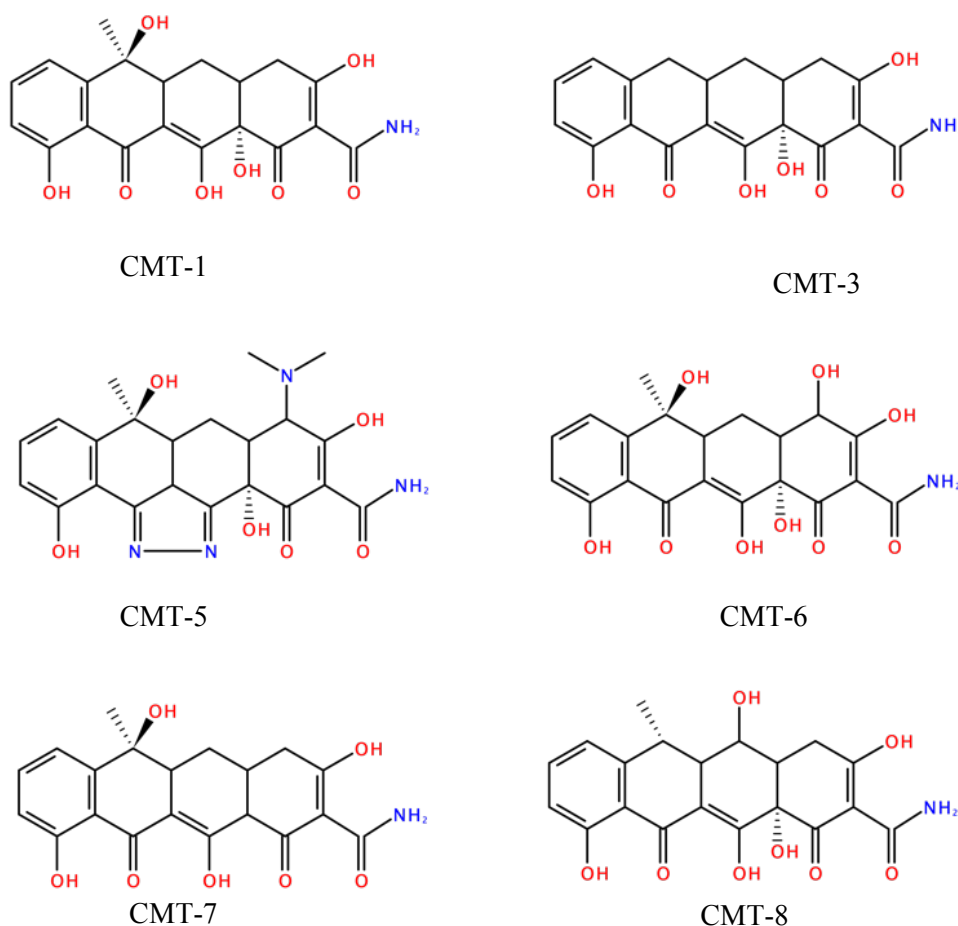
**Figura IV.2.2.: Estructuras químicas de los antibióticos correspondiente a la Tabla III con actividad anti-amiloidogénica.** Las zonas azules resaltan el motivo de interacción  $\beta$ -entrecruzado.

La MCS encontrada será denominada en lo sucesivo  $\text{C}\beta\text{-IM}$  (Motivo de interacción  $\beta$ -entrecruzado) y representaría una distribución espacial óptima para competir y/o interferir con la formación de la estructura entrecruzada- $\beta$  común a las estructuras amiloides.

Usando el  $\text{C}\beta\text{-IM}$  extraído de moléculas con propiedades anti-amiloidogénicas reportadas, se trabajó con la familia de las tetraciclinas (TC) con el objetivo de detectar algún miembro con baja actividad antibiótica para testear *in vitro* su potencial como inhibidor de la agregación. Se eligió para esta búsqueda la familia de las TC ya que este

grupo de compuestos posee una interesante pleiotropía funcional y una gran versatilidad para a las modificaciones químicas. Además, está bien reportado que la actividad antibiótica de las TC reside en el grupo dimetilamino ubicado en el carbono C4 (146, 189).

Esto permitió delimitar el espectro de búsqueda en las tetraciclinas 4-de-dimetilamino, también llamadas tetraciclinas modificadas químicamente (CMT, del inglés, *chemically modified tetracyclines*). Existen al menos 10 CMTs, de las cuales seis de ellas están bien caracterizadas (Figura IV.2.3). Estas moléculas con actividad antibiótica disminuida presentan ventajas sobre las TC convencionales como ser su rápida absorción, poseen una vida media en suero más prolongada que la tetraciclina, la administración sistémica a largo plazo no produce toxicidad gastrointestinal, no desarrolla resistencia a los antibióticos, y pueden utilizarse durante períodos prolongados (190).



**Figura IV.2.3: Estructuras químicas de las diferentes tetraciclinas modificadas químicamente (CMTs).**

Una de las características a tener en cuenta para realizar el reposicionamiento de una molécula es que debe ser activa en el SNC y debe reunir ciertas características



fisicoquímicas fundamentales para penetrar la barrera hematoencefálica. Por esta razón, luego de varios estudios con diferentes compuestos Lipinski y colaboradores (191) llegaron a la conclusión de que para que un compuesto sea activo en el SNC y pueda atravesar la barrera hematoencefálica debe cumplir con la “Regla los de cinco”. La "Regla de los cinco" se denomina así porque todas las propiedades físicas esenciales que debe presentar un fármaco son parámetros de cinco. De acuerdo con esta regla, es probable una buena absorción y permeabilidad si:

- El peso molecular debe ser menor o igual a 450 Da.
- El coeficiente de distribución entre octanol / agua (LogP) debe ser menor o igual a 5. Este coeficiente representaría la lipofilidad. Para varias clases de sustancias activas en el SNC, Hansch y Leo (192) encontraron que el valor LogP está en el rango de 1.5-2.7, con un valor medio de 2.1.
- Los donantes de enlaces hidrógeno deben ser menor o igual a 5 (expresados como la suma de OH y NH)
- Los aceptadores de enlace hidrógeno deben ser menor o igual a 10 (expresado como la suma de Ns y Os).
- El número de enlaces rotativos debe ser menor o igual a 10.

Teniendo en cuenta la Regla de los cinco se realizó una búsqueda, en la base de datos de química abierta PubChem (NHI), de los parámetros fisicoquímicos de las diferentes CMTs y sus valores se encuentran recopilados en la Tabla IV.

Compuesto	Peso Molecular (g/mol)	LogP	Donantes de enlace hidrógeno	Aceptor de enlace hidrógeno	Número de enlaces rotativos
CMT-1	401,371	0,1	6	8	1
CMT-3	371,345	1	5	7	1
CMT-5	397,387	-1	6	8	1
CMT-6	417,37	-2,7	7	9	1
CMT-7	385,372	0,9	5	7	1
CMT-8	385,372	1,3	5	7	1

**Tabla IV:** Tabla de valores de peso molecular, coeficiente de partición octanol/agua (LogP), donantes y aceptor de enlace hidrógeno de las diferentes CMTs.

---

Analizando las estructuras químicas de las diferentes CMTs que contienen el motivo C $\beta$ -IM, surgió CMT-3 como una candidata para los estudios de la actividad anti-agregante porque posee parámetros fisicoquímicos adecuados para ser activa en el SNC y para atravesar la barrera hematoencefálica. Además, posee todos los ensayos preclínicos aprobados y actualmente se encuentra en estadios de ensayos clínicos contra tumores cerebrales, debido a su capacidad de inhibir metaloproteinasas esenciales para las metástasis tumorales (193, 194).

### **IV.3: Estudio del efecto de la CMT-3 en el proceso de agregación de la proteína $\alpha$ -sinucleína**

Golub y colaboradores demostraron que las propiedades antimicrobiana y anticolagenasa de las tetraciclinas residían en diferentes partes de los cuatro anillos (147). Pudieron identificar a la cadena lateral de la posición del carbono 4 como responsable de la actividad antimicrobiana de esta familia de antibióticos. Los compuestos 4-dedimetil amino tetraciclina perdían las propiedades antimicrobianas, y luego de obtenerlos mediante modificaciones químicas, constituyeron una nueva familia de compuestos denominada CMT. Desde entonces se han sintetizado varias CMTs más. Entre ellas, CMT-1, CMT-3 y CMT-8, las cuales se han probado para aplicaciones periodontales por su actividad antiinflamatoria. Las CMT-3 y CMT-8 tienen, además, actividad antimetastásica en diferentes tumores (195, 196).

Las CMTs contienen el motivo estructural C $\beta$ -IM. La CMT-3, además, podría ser directamente reposicionada ya que posee estudios preclínicos y clínicos aprobados (193, 197, 198). Por este motivo, en esta sección centraremos nuestros estudios en la capacidad de CMT-3 de inhibir la formación de agregados amiloides de la  $\alpha$ -sinucleína (199).

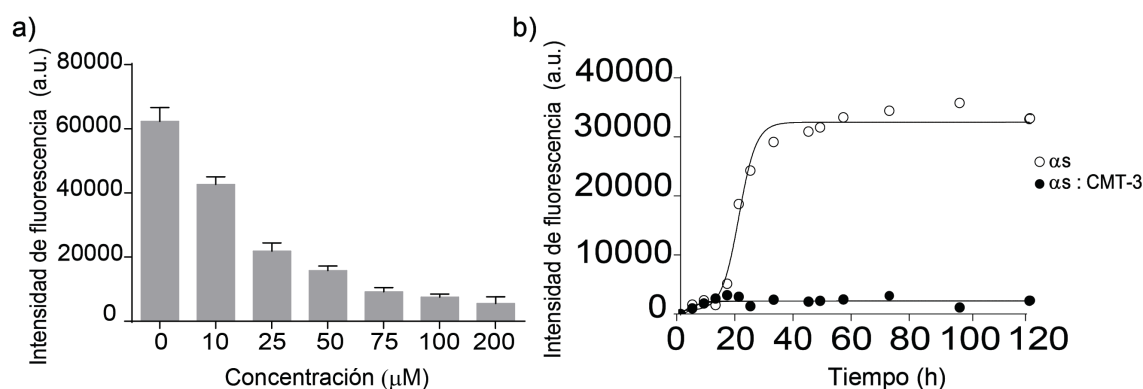
En primer lugar, se comparó la actividad antibiótica de la doxiciclina y de la CMT-3 frente a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . De acuerdo a nuestros resultados, la CMT-3 tiene un poder antibiótico 8 veces menor que la doxiciclina. La medición de la actividad antibiótica se llevó a cabo mediante diluciones doble seriadas, y luego se midió la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Tabla V).

Compuesto	Ultima dilución con halos de inhibición	CIM
Doxiciclina	1/16	31,25 $\mu$ g/mL
CMT-3	1/2	250 $\mu$ g/mL

**Tabla V. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de la doxiciclina y la CMT-3 frente a *E. coli* DH5 $\alpha$ .**

Luego, para estudiar el efecto de la CMT-3 sobre la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína se utilizó la espectroscopía de fluorescencia siguiendo el espectro de emisión de la Tioflavina T (ThT). La Figura IV.3.1a muestra un estudio dosis-respuesta de la CMT-3 sobre la agregación de la proteína. Para esto, se incubó una solución de 70  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína durante 96 h con diferentes concentraciones de la CMT-3 a 37 °C bajo agitación orbital. Los resultados obtenidos muestran que la CMT-3 es capaz de inhibir la

agregación amiloide de la  $\alpha$ -sinucleína a partir de una concentración de 75  $\mu\text{M}$ . El efecto inhibitorio total se consiguió a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  de la CMT-3, por lo que esta concentración fue la elegida para el resto de los experimentos. La Figura IV.3.1b muestra la cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia y en ausencia de 100  $\mu\text{M}$  de la CMT-3. Aquí, el control exhibe una cinética característica para esta proteína con una fase de latencia hasta las 18 h, seguido por la fase exponencial, y alcanzando la fase estacionaria a las 44 h. Por el contrario, en presencia de la CMT-3 no se observó un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia de la ThT hasta las 120 h de incubación bajo nuestras condiciones experimentales. Con estos resultados concluiríamos que en presencia de la CMT-3 no se formarían especies agregadas de tipo amiloide.



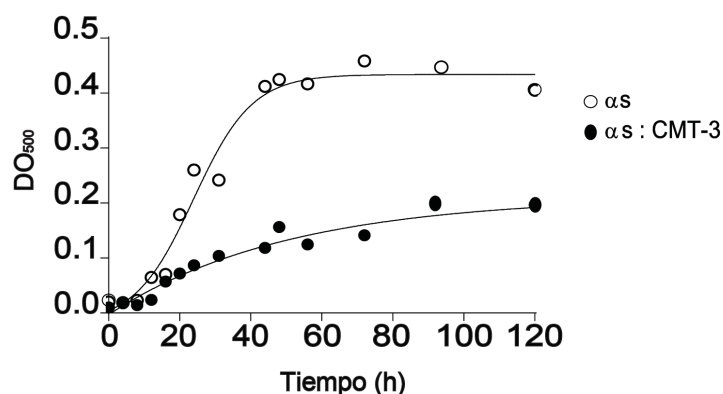
**Figura IV.3.1. Efectos de la CMT-3 en la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína.** (a) Dosis-respuesta medida a las 96 h de incubación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de distintas concentraciones de la CMT-3 a 37 °C con agitación orbital. (b) Intensidad de emisión de la fluorescencia de 25  $\mu\text{M}$  de la ThT en una solución que contiene 70  $\mu\text{M}$  de la  $\alpha$ -sinucleína sola (círculos vacíos), o con la adición de 100  $\mu\text{M}$  de la CMT-3 a 0 h (círculos llenos).

Es posible que la falta de detección de especies agregadas mediante el aumento en la intensidad de la fluorescencia de la emisión de la ThT se deba a la ausencia de cantidades significativas de estructura  $\beta$ -entrecruzada, y no a la ausencia de especies agregadas. Por esta razón, para determinar si durante las primeras horas del proceso de agregación se estarían formando especies oligoméricas o protofibrilares se consideró a otras técnicas biofísicas como la turbidimetría y la dispersión de la luz.

La turbidez de una solución (o densidad óptica) es proporcional tanto al tamaño como a la cantidad de agregados presentes en una solución, de manera que puede usarse como una herramienta para evaluar la agregación de especies proteicas. Para ello, la dispersión de luz se determina espectrofotométricamente en el rango UV-visible,

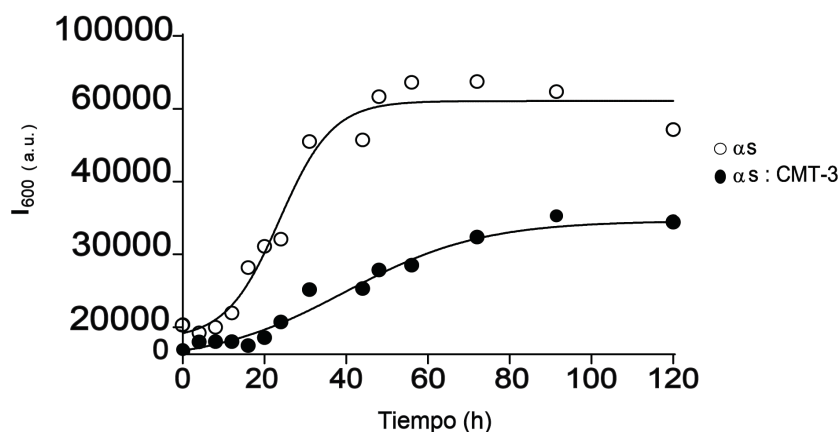
utilizando longitudes de ondas a partir de 320 nm donde las proteínas no tienen una absorbancia significativa.

En la Figura IV.3.2. se representa la cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 37 °C con agitación orbital en ausencia o en presencia de la CMT-3 medida por turbidimetría. Los resultados muestran que en ambos casos hay formación de partículas de mayor tamaño que el monómero de la proteína, pero con una cinética diferente. En ausencia de la tetraciclina, obtenemos una curva que ajusta a una función sigmoidea con un tiempo de latencia de 8 h seguida por una fase exponencial que alcanza el estado estacionario a las 44 h. Esto se encuentra en concordancia con los experimentos llevados a cabo utilizando la ThT para la misma muestra. Sin embargo, en presencia de CMT-3 la dispersión de la luz aumenta en forma exponencial con el tiempo. Es decir, que en presencia de esta tetraciclina también se formaron agregados pero podrían tener un tamaño menor comparado con los agregados formados en ausencia de la CMT-3 ya que a las 120 h la turbidez en presencia de la CMT-3 es 48% menor.



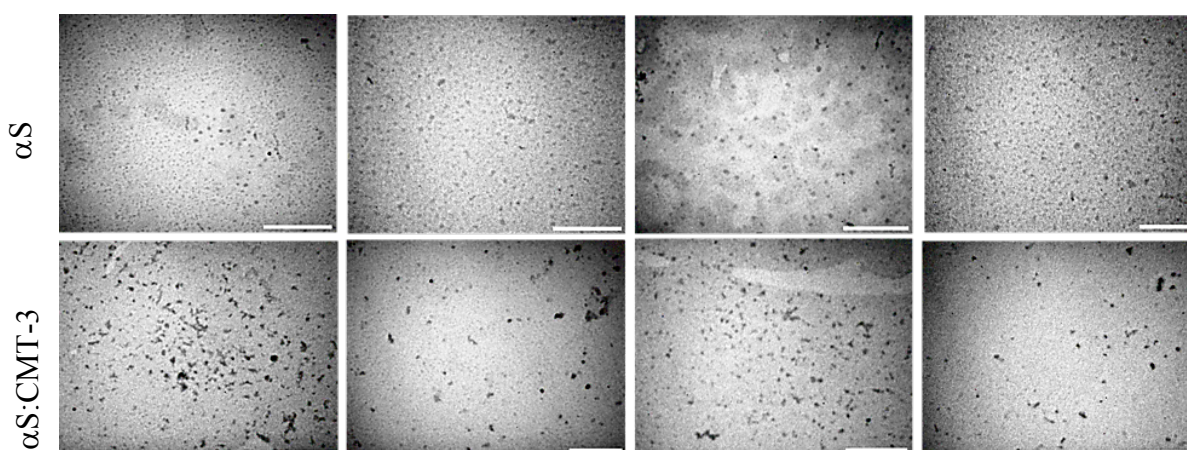
**Figura IV.3.2. Efectos de la CMT-3 en la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína medidos por densidad óptica.** Densidad óptica medida a 500 nm en función del tiempo de una solución que contiene 70  $\mu$ M de la  $\alpha$ -sinucleína sola (círculos vacíos), o con la adición de 100  $\mu$ M de la CMT-3 a tiempo 0 h (círculos llenos).

Como se mencionó anteriormente, la dispersión de la luz medida en un espectrofluorómetro también es una de las herramientas para estudiar la cinética de agregación de una proteína. Para estudiar el sistema  $\alpha$ -sinucleína:CMT-3 se irradió las muestras a 300 nm y se midió la dispersión de la luz al doble de la longitud de onda, es decir, a 600 nm. En la Figura IV.3.3. se observa que tanto en presencia como en ausencia de la CMT-3 hay cambios significativos en la dispersión de la luz, indicando la formación de especies agregadas en ambos casos, aunque con cinéticas de agregación diferentes como se observó anteriormente con el ensayo de turbidimetría.



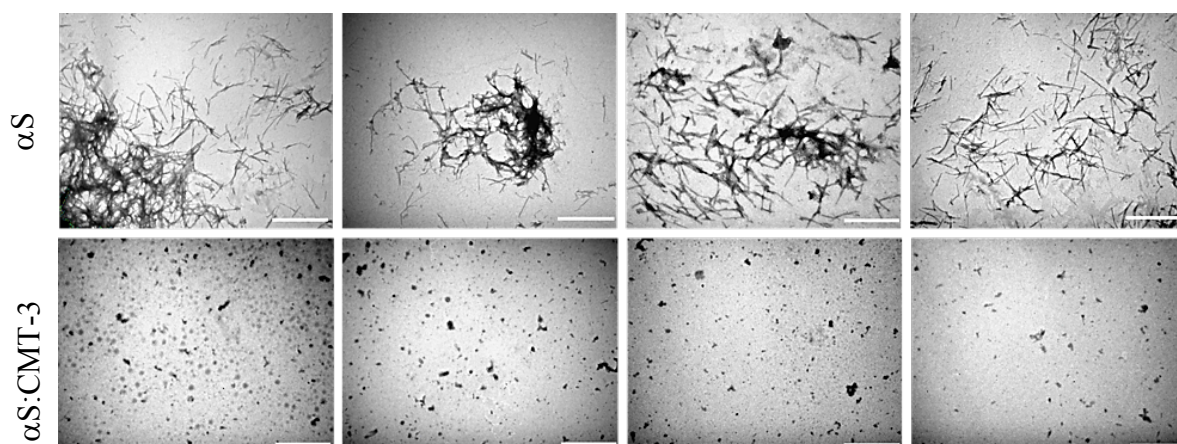
**Figura IV.3.3. Efectos de CMT-3 en la agregación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína medidos por dispersión de la luz.** Intensidad medida a 600 nm de solución que contiene 70  $\mu$ M de la  $\alpha$ -sinucleína sola (círculos vacíos), o con la adición de 100  $\mu$ M de la CMT-3 a tiempo 0 h (círculos llenos).

Para corroborar la formación de las especies agregadas de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia y en ausencia de la CMT-3 se utilizó diferentes microscopías electrónicas. Para ello las muestras, que fueron replicadas tres veces, se montaron en las grillas y se pusieron en contacto con Uranyless para dar contraste. Durante la observación se adquirió imágenes en 20 campos distintos por grilla en cada uno de los diferentes experimentos realizados. En primer lugar, se analizó las especies las agregadas en presencia y en ausencia de la CMT-3 a 16 h y 120 h mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En la Figura IV.3.4. se presentan campos representativos de las muestras de 16 h de incubación, donde claramente se observan las especies oligoméricas tanto en ausencia de la CMT-3 (arriba) como en presencia de esta tetraciclina modificada (abajo).



**Figura IV.3.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET).** Muestras de  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la CMT-3 (abajo) observadas a las 16 h. La barra de escala corresponde a 500 nm de 46.000X de magnificación para la observación de oligómeros.

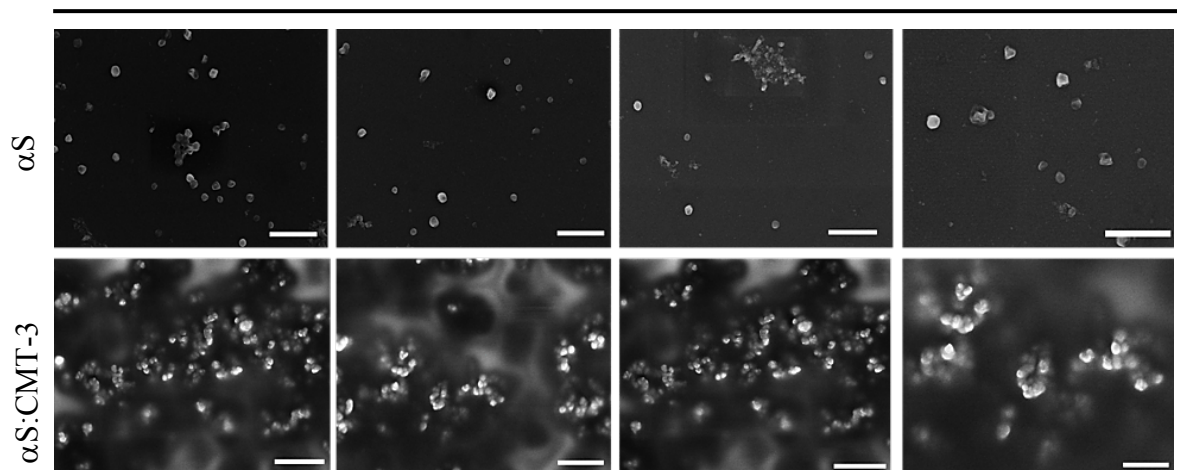
Un resultado fundamental se ilustra en la Figura IV.3.5 donde la comparación de las imágenes permite aseverar que no se encontraron fibras amiloides en las muestras incubadas con CMT-3 durante 120 h. Este resultado fue consistente a lo largo de los 75 campos analizados en las grillas. La ausencia de fibras es congruente con la ausencia de estructuras  $\beta$ -entrecruzada reportada por los experimentos de fluorescencia de la ThT. A partir de estos datos podemos concluir que la CMT-3, al igual que la doxiciclina, inhibe la formación de especies fibrilares características del proceso de la agregación amiloide de la  $\alpha$ -sinucleína.



**Figura IV.3.5. Microscopía electrónica de transmisión (MET).** Muestras de  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la CMT-3 (abajo) observadas a las 120 h. La barra de escala corresponde a 1  $\mu$ m de 26.000X de magnificación para la observación de las muestras.

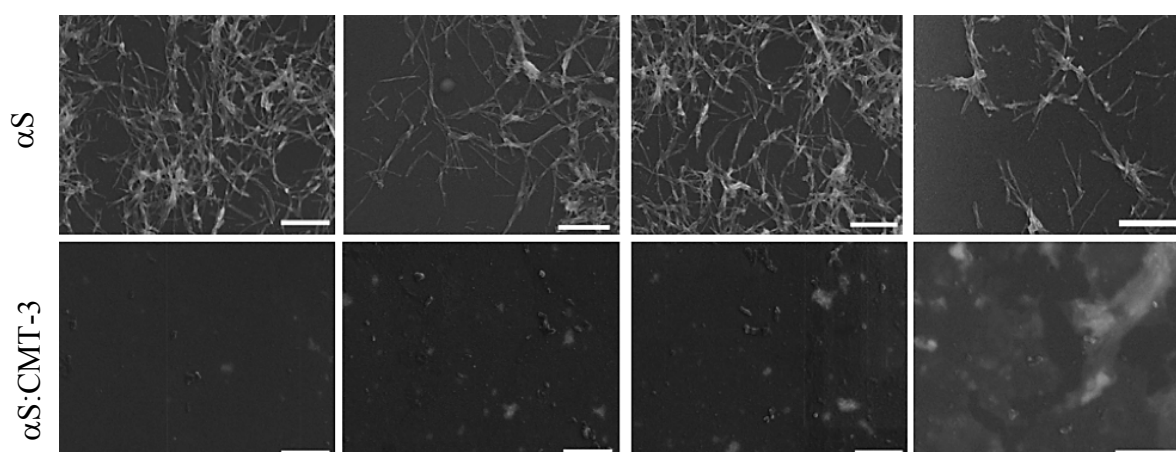
Para obtener una mayor información de estas muestras, las grillas preparadas para MET se llevaron al microscopio electrónico de barrido (MEB). La configuración del equipo y la selección de los parámetros de operación nos permitieron observar las muestras sin metalizar. En la Figura IV.3.6. se observan en ambas condiciones de agregación, en presencia y ausencia de CMT-3, diferentes especies oligoméricas formadas durante 16 h de incubación. Mediante el programa Imagen J se realizaron mediciones del tamaño de las especies formadas. El tamaño de las especies oligoméricas en ausencia de CMT-3 es de  $40 \pm 10$  nm de diámetro, mientras que en presencia de la tetraciclina modificada el tamaño de estas especies es mayor, con un diámetro de  $80 \pm 10$  nm. Estos datos de fueron calculados en base a  $n=50$  para cada condición.





**Figura IV.3.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB).** Muestras de  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la CMT-3 (abajo) observadas a las 16 h. La barra de escala corresponde a 500 nm de 100.000X de magnificación para la observación de los oligómeros.

Luego se observó en MEB las muestras de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia y en presencia de la CMT-3 a 120 h de incubación (Figura IV.3.7.). Las imágenes muestran la ausencia de fibras para las muestras tratadas con la tetraciclina, sugiriendo que actúa en forma efectiva como anti-agregante de la proteína inhibiendo la formación de las fibras amiloides. Las fibras amiloides tienen un diámetro de  $15 \pm 5$  nm ( $n=50$ ) y el largo de las fibras aisladas es de  $500 \pm 50$  nm ( $n=25$ ).

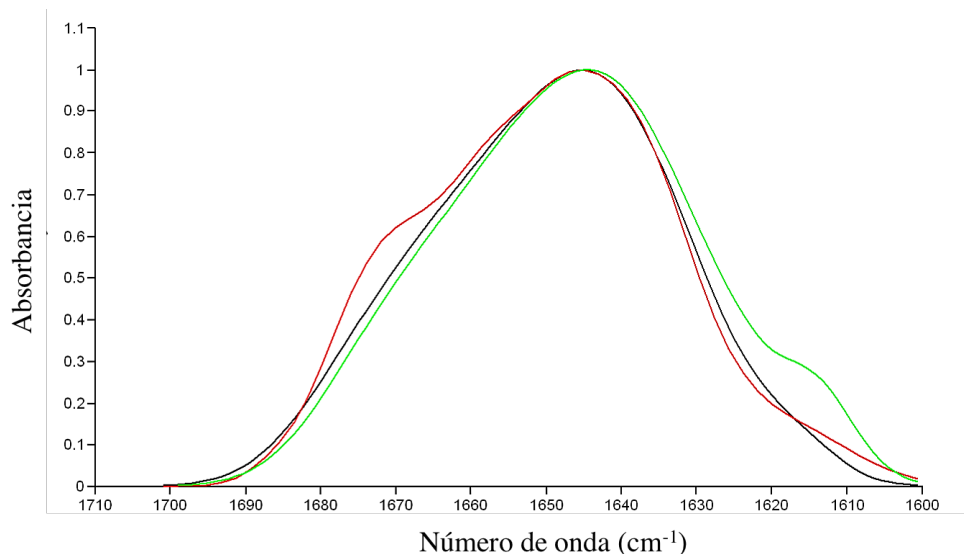


**Figura IV.3.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB).** Muestras de  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la CMT-3 (abajo) observadas a las 120 h. La barra de escala corresponde a 500 nm de 100.000X de magnificación para la observación las muestras.

Con el fin de realizar un análisis comparativo entre las especies oligoméricas de  $\alpha$ -sinucleína producidas en ausencia y en presencia de la doxiciclina o de la CMT-3, las muestras disueltas en medio deuterado se incubaron durante 16 h y luego se montaron en una celda para la colección de espectros de infrarrojo. La comparación de los espectros



en la región Amida I (Figura IV.3.8) indica claramente que el contenido de estructuras secundarias es diferente para las especies formadas en ausencia como en presencia de las tetraciclinas.

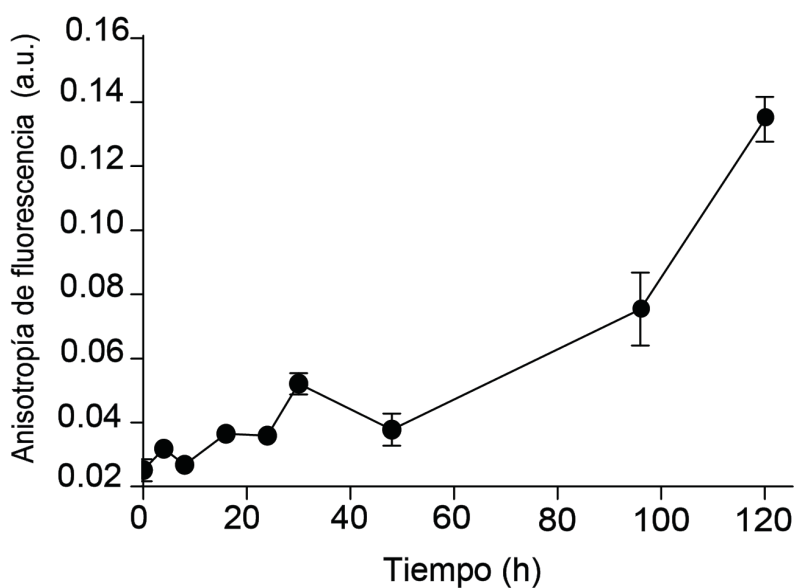


**Figura IV.3.8. FT-IR de la región Amida I.** Espectros normalizados de la  $\alpha$ -sinucleína en ausencia (línea negra) o en presencia (línea roja) de la doxiciclina o (línea verde) de la CMT-3. Muestras incubadas a 37 °C, pD 7,4 bajo agitación orbital: 0 h control de la  $\alpha$ -sinucleína o 16 h en presencia de las diferentes tetraciclinas.

La anisotropía fluorescencia permite determinar la difusión rotacional de una molécula a partir de la diferencia en la correlación (decorrelación) de la luz polarizada, es decir entre los fotones que se excitan y los emitidos (fluorescentes). Esta decorrelación permite medir el "tiempo de rotación" de una molécula en su conjunto, o de una parte de la molécula con respecto al todo. Básicamente, un fluoróforo excitado con luz polarizada también emitirá luz polarizada. Sin embargo, si una molécula está rotando, tenderá a "disipar" la polarización de la luz al irradiar en una dirección distinta a la de la luz incidente (despolarización de la luz). El efecto de "disipación" es mayor con fluoróforos que rotan libremente en una solución. Las interacciones de proteínas pueden ser detectadas cuando una de las partes que interactúan se acopla con un fluoróforo, y al acoplarse con la molécula se forma un complejo más grande el cual rotará en forma más lenta. Por lo tanto, aumentará la polarización de la luz emitida y se reduce por consiguiente el efecto de "disipación".

La molécula CMT-3 posee fluorescencia intrínseca y la convierte en un marcador para estudios de difusión rotacional de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Entonces, se excitó

la molécula con luz polarizada a 460 nm y se midió la emisión a 520 nm. La tetraciclina fue adicionada a diferentes tiempos de la reacción de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína.



**Figura IV.3.9. Anisotropía de fluorescencia.** Curva de anisotropía de fluorescencia de una solución de 70  $\mu$ M de la  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital, adicionando la CMT-3 a diferentes tiempos. Las barras indican la desviación estándar con un n=6.

La Figura IV.3.9 muestra que la anisotropía de fluorescencia de la CMT-3 comienza a incrementar sólo cuando hay especies agregadas presentes en el medio, es decir a partir de las 44 h. Esto implica que el fármaco sólo se une cuando hay especies agregadas de mayor tamaño y no al monómero de la proteína.

#### **IV.4: Capacidad de la CMT-3 de interactuar y desestabilizar la estructura cuaternaria de especies fibrilares de la proteína $\alpha$ -sinucleína**

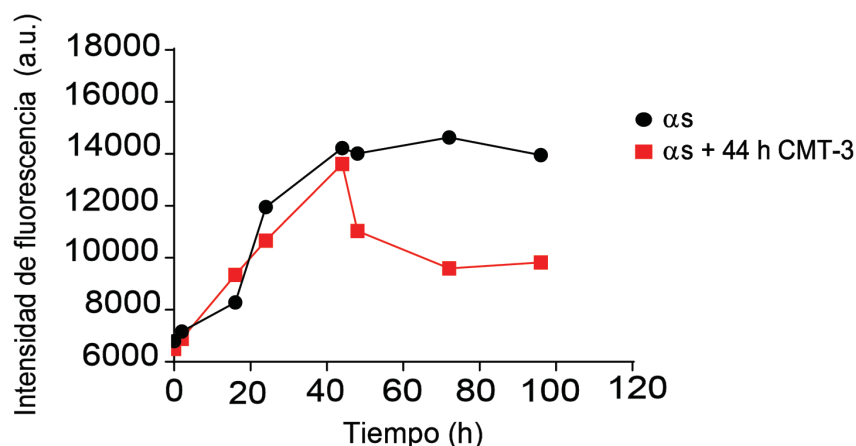
La toxicidad de las especies fibrilares ha sido discutida, otorgando sólo a las especies oligoméricas la capacidad de alterar la viabilidad celular. Sin embargo, recientemente se demostró que las especies fibrilares son también tóxicas al menos sobre dos blancos: *i)* producen una reestructuración estructural en la membrana plasmática agregando los dominios conocidos como “*lipid rafts*” e induciendo en consecuencia la activación de la caspasa-8, y *ii)* diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que las especies fibrilares de la  $\alpha$ -sinucleína serían las responsables de activar los procesos neuroinflamatorios estrechamente relacionados con los procesos neurodegenerativos (200, 201).

En este contexto y considerando las características estructurales de las Tetraciclinas, en esta sección abordaremos estudios tendientes a dilucidar la capacidad de la CMT-3 para interactuar con y/o remodelar agregados fibrilares de  $\alpha$ -sinucleína transformándolos en especies de menor toxicidad.

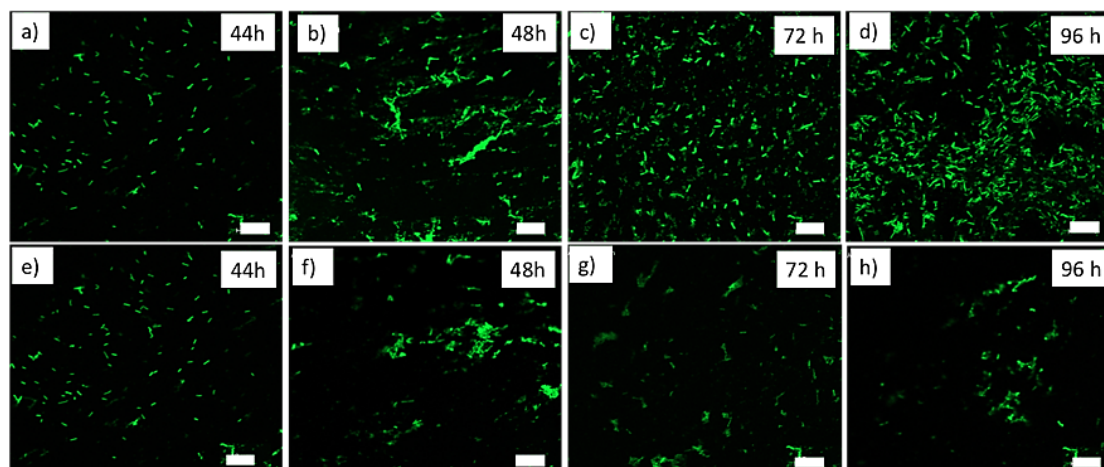
La Figura IV.4.1 muestra la intensidad de fluorescencia de la sonda ThT resultado de la cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia y en presencia de la CMT-3. Esta tetraciclina se colocó en la muestra al principio de la fase estacionaria, es decir, luego de 44 h de incubación. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se evaluó el efecto de la CMT-3 sobre las fibras preformadas midiendo la intensidad de fluorescencia de la sonda. Como se describió en la parte 1 de Resultados, el agregado de la doxiciclina a las 44 h arrojó valores indistinguibles respecto al control. Sin embargo, como podemos observar en la Figura IV.4.1., la adición de la CMT-3 induce una disminución de la intensidad de fluorescencia de la sonda en un 50%.

La cinética de desensamblado de las fibras de  $\alpha$ -sinucleína también se estudió mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para esto, se tomaron muestras a diferentes tiempos a partir de las 44 h de la reacción de agregación de la proteína en ausencia y en presencia de la CMT-3. Las muestras se marcaron con Tioflavina S (ThS), una sonda fluorescente análoga a la ThT que tiene la capacidad de unirse a estructuras  $\beta$ -entrecruzadas. Como se ve en las imágenes (Figura IV.4.2 a-d) la intensidad de fluorescencia de ThS de las muestras tomadas en ausencia de la CMT-3 aumenta con el tiempo, indicando la formación de fibras amiloides (pequeños bastones color verde). Lo contrario ocurre con la cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la CMT-3

a partir de 44 h de incubación (Figura IV.4.2 e-h). En este caso, la intensidad de la fluorescencia se mantiene igual a las muestras sin el agregado de la CMT-3 hasta las 48 h (Figura IV.4.2 b). Sin embargo, a partir de las 72 h la intensidad de la fluorescencia en las muestras tratadas con la CMT-3 comienza a disminuir (Figura IV.4.2 g-h).



**Figura IV.4.1. Desensamblado de las fibras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína medida por espectroscopía de fluorescencia.** Intensidad de la emisión de la fluorescencia de 25  $\mu$ M de Tioflavina T en una solución que contiene 70  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína (línea negra), o con la adición de 100  $\mu$ M de la CMT-3 (línea roja) a 44 h de incubación.

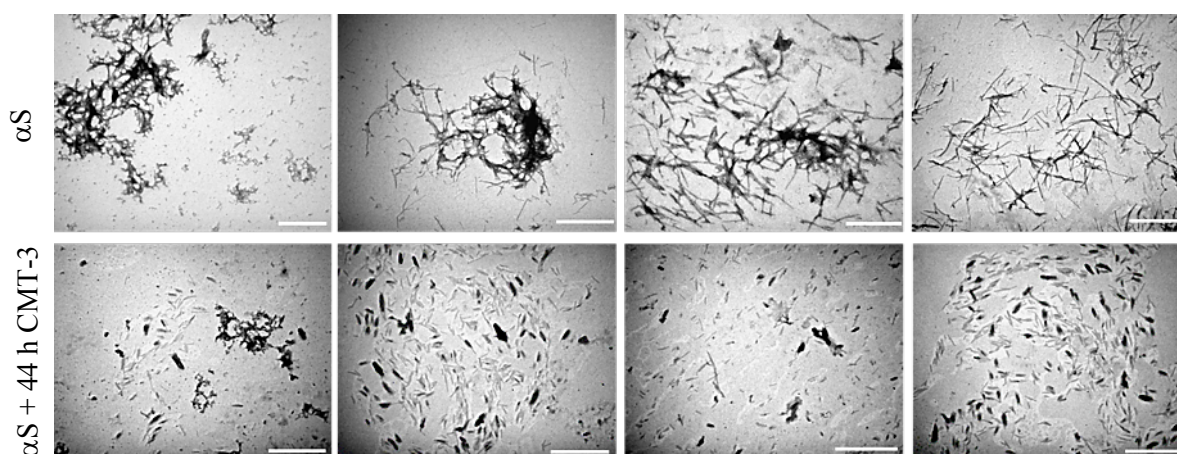


**Figura IV.4.2. Microscopía confocal del desensamblado de las fibras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína.** Intensidad de emisión de la fluorescencia de la Tioflavina S a distintos tiempos de la cinética de agregación a) 44h, b) 48h, c) 72h y d) 96 h de una solución que contiene 70  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia (arriba) o en presencia (abajo) de 100  $\mu$ M de la CMT-3, colocado a las 44 h. La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m.

Esta disminución en la fluorescencia de la sonda tiene dos interpretaciones posibles: *i*) disminución en la cantidad de estructuras  $\beta$ -entrecruzadas en el medio como producto de un desensamblado de las fibras, o *ii*) apantallamiento de la fluorescencia de la sonda por algún cambio conformacional inducido por la interacción de la CMT-3. Por ello, para corroborar que el fenómeno observado se debe a un proceso de desensamblado de las fibras amiloide de la  $\alpha$ -sinucleína, y para una mayor caracterización morfológica

de las especies resultantes, se trabajó con diferentes microscopías electrónicas y la microscopía de fuerza atómica.

La Figura IV.4.3 muestra las imágenes obtenidas utilizando MET de las fibras de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia o en presencia de la CMT-3 adicionado a las 44 h de incubación, con un tratamiento total de 96 h. La examinación de diferentes campos de la grilla muestra claramente que cuando las fibras son tratadas con la CMT-3 la cantidad de fibras y cúmulos de fibras disminuyen notablemente y que las especies resultantes presentan una morfología diferente luego del tratamiento. Por otro lado, el análisis de la longitud de las fibras empleando el programa Image-J, indica que las fibras remanentes luego del tratamiento con la CMT-3 son más cortas (longitud  $170 \pm 70$  nm con un  $n=25$ ) que las que se encuentran en ausencia de la tetraciclina. Estos resultados confirmarían que la CMT-3 es capaz de interaccionar y desensamblar fibras preformadas.

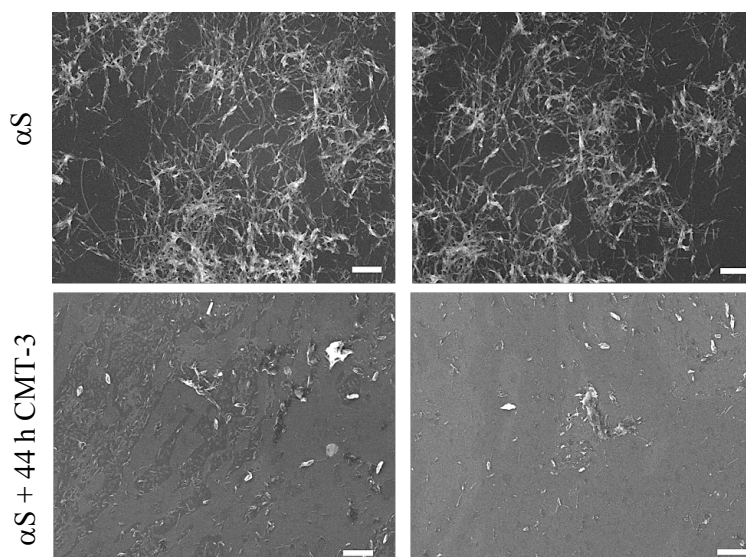


**Figura IV.4.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET).** Muestras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la CMT-3 (abajo) agregado a las 44 h, con un tiempo de incubación total de 96 h. La barra de escala corresponde a 1  $\mu$ m de 26.000x de magnificación para la observación de las muestras.

Para completar la caracterización morfológica las muestras fueron paralelamente estudiadas mediante MEB. La toma de imágenes se realizó utilizando dos aumentos diferentes lo que permitió estimar la cantidad de fibras presente en la muestra. En las imágenes tomadas a menor magnificación (50.000X) se tiene una vista panorámica de las muestras en presencia y ausencia de la CMT-3 donde la gran cantidad de agregados fibrilares forma cúmulos. En consonancia con lo observado con las técnicas precedentes,

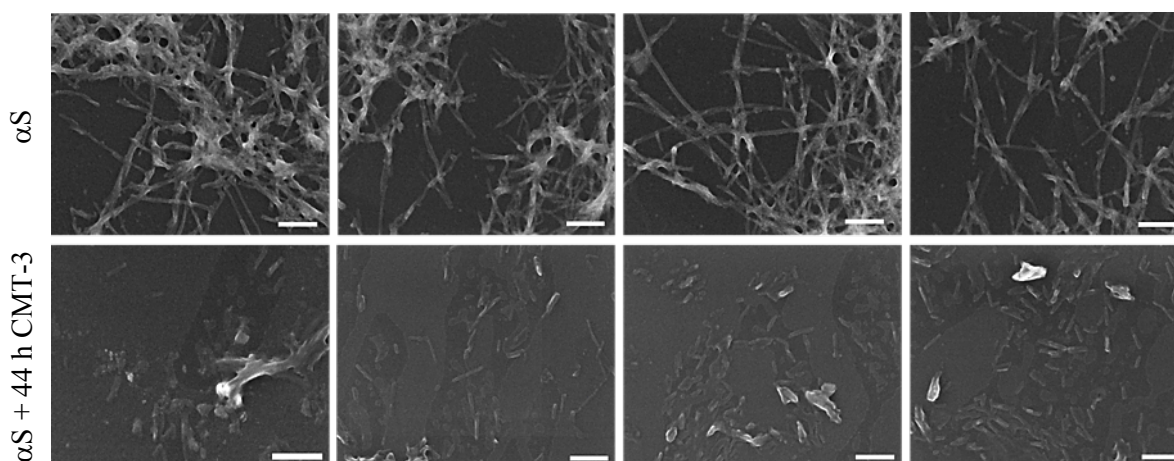


las muestras obtenidas en presencia de la CMT-3 evidencian una disminución notoria del número de especies agregadas y ausencia de los conglomerados (Figura IV.4.4).



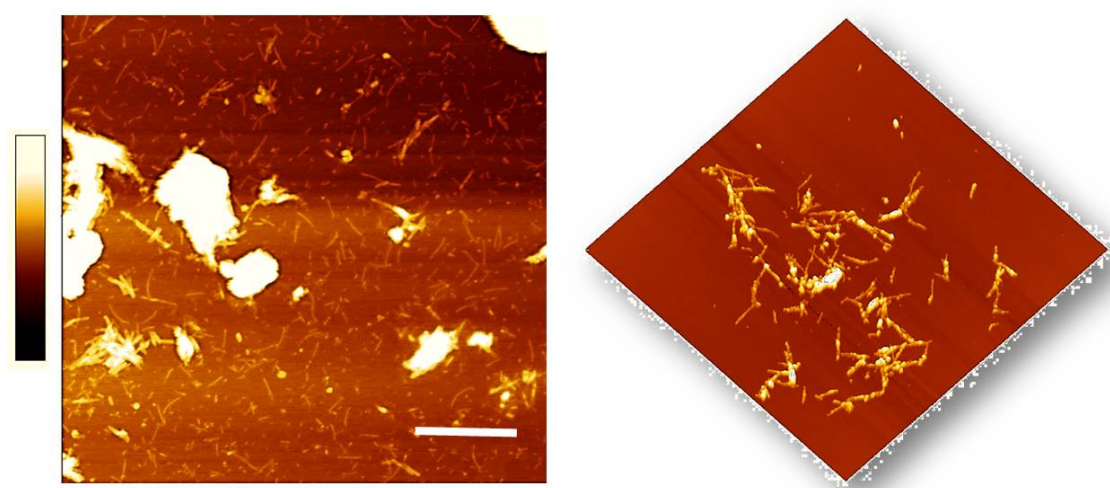
**Figura IV.4.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB).** Muestras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la CMT-3 (abajo) agregado a las 44 h la CMT-3, con un tiempo de incubación total de 96 h. La barra de escala corresponde a 500 nm de 50.000X de magnificación para la observación las muestras.

Posteriormente, utilizando una mayor magnificación (200.000X) se pudo observar con mayor detalle las muestras de  $\alpha$ -sinucleína incubadas en ausencia de la CMT-3 y las sometidas al tratamiento con el compuesto a partir de las 44 h. En ausencia del compuesto se pueden observar fibras de 500 nm a varias micras de largo, que se entrecruzan entre ellas formando los cúmulos. La presencia de CMT-3 conlleva el desensamblado de las especies fibrilares a fibras más cortas y a otras especies como monómeros o agregados de bajo peso molecular (Figura IV.4.5.).



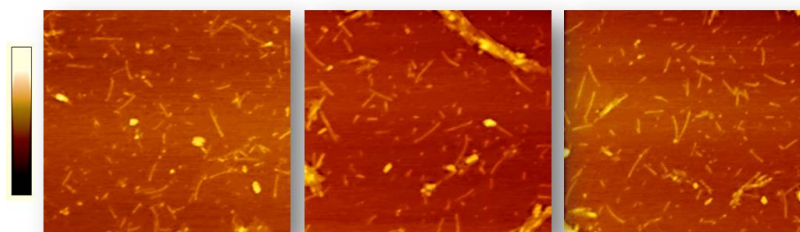
**Figura IV.4.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB).** Muestras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína incubadas a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia (arriba) o en presencia de la CMT-3 (abajo) agregado a las 44 h, con un tiempo de incubación total de 96 h. La barra de escala corresponde a 200 nm de 200.000X de magnificación para la observación las muestras.

Para completar la caracterización microscópica del efecto de la tetraciclina sobre las especies fibrilares de  $\alpha$ -sinucleína, se utilizó la microscopía de fuerza atómica (AFM) adquiriendo las imágenes en el modo de contacto intermitente (*TM-Peak Force*). En la Figura IV.4.6 podemos observar imágenes representativas de la muestra luego de 96 h de incubación en ausencia de la CMT-3, donde las fibras amiloides están en forma individual, en ramillete o conformando grandes cúmulos de fibras. Para poner en evidencia la información 3D que tiene cada punto de la imagen se eligió presentar una de las imágenes en perspectiva (derecha). La diferencia de altura entre los cúmulos y las fibras individuales (30 nm de diámetro) dificulta la elección de la escala de colores.



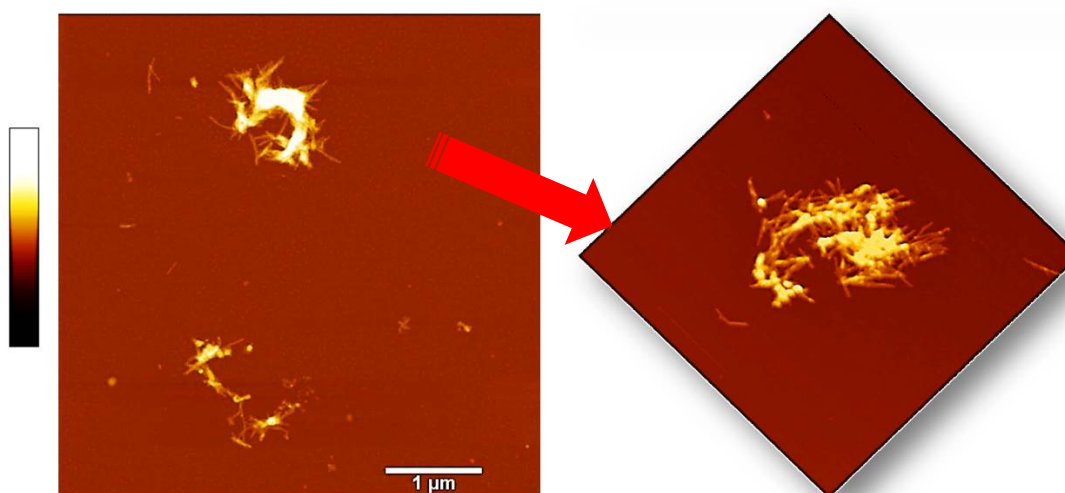
**Figura IV.4.6. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).** Imágenes de la topografía de la muestra de  $\alpha$ -sinucleína incubada a 37 °C bajo agitación orbital en ausencia de la CMT-3. Las imágenes fueron adquiridas en el modo de operación de contacto intermitente *TM-Peak Force*. La barra blanca representa 1  $\mu$ m y la escala de colores codifica la información en  $z$  de 0 a 100nm. La imagen de la derecha es una vista en 3 dimensiones presentada con un ángulo elevación de 75° y una rotación de 45°.

A partir de la imagen anterior se hizo una inspección más aumentada de la morfología de las fibras y los resultados se encuentran en la Figura IV.4.7.



**Figura IV.4.7. Fibras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína por AFM.** Cada imagen topográfica tiene un área de barrido de 1x1  $\mu$ m, y la barra de colores codifica la información en  $z$  de 0 a 100 nm.

Sin embargo, al igual que en las microscopías electrónicas las fibras tratadas con la CMT-3 se observó que el número de fibras individuales y la cantidad de cúmulos de fibras formados disminuye notablemente con respecto a las muestras de la proteína no tratada (Figura IV.4.8.).

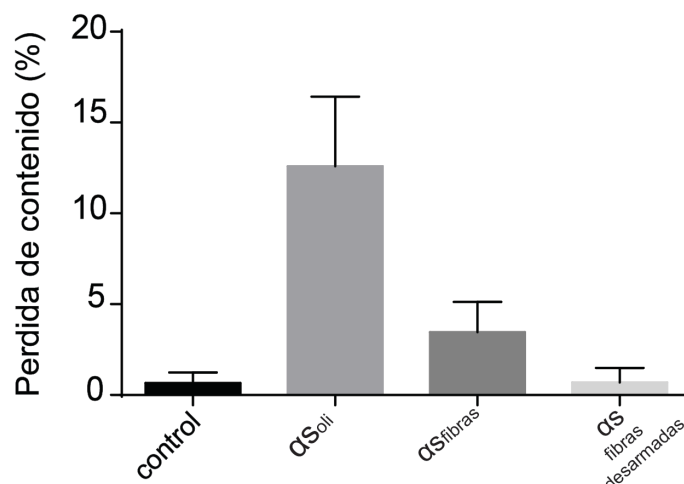


**Figura IV.4.8. Fibras de la proteína  $\alpha$ -sinucleína tratadas con la CMT-3 mediante AFM.** A la izquierda, la imagen de topografía tiene un área de barrido de 5x5μm, y la barra de colores codifica la información en  $z$  de 0 a 100 nm. La imagen de la derecha es una vista en 3 dimensiones del cúmulo de fibras observado en la imagen de topografía con un ángulo elevación de 75° y una rotación de 45°.

Luego de esta caracterización morfológica, se evaluó la actividad de las especies resultantes del proceso de desensambado sobre vesículas lipídicas empleando el ensayo de pérdida de contenido. Para esto se encapsuló 50 mM de calceína en vesículas lipídicas unilamelares preparadas con una mezcla de lípidos sintéticos DOPC: DOPA (1:1), y se evaluó la capacidad de las especies resultantes del desensamblado de alterar la liberación de la sonda al medio. La Figura IV.4.9. muestra que la especie monomérica de  $\alpha$ -sinucleína no induce cambios de permeabilidad en las vesículas lipídicas, las especies oligoméricas (cosechadas luego de 16 h de incubación), son capaces de desestabilizar las membranas produciendo una liberación de la calceína que se evidenció por el incremento en su intensidad de fluorescencia. De esta manera queda confirmada la capacidad de estas especies de alterar la integridad de las bicapas lipídicas. Las especies fibrilares maduras en ausencia de la CMT-3 indujeron un pequeño pero significativo cambio de permeabilidad producido probablemente por especies oligoméricas que presentes en la muestra ya que estas no fueron sometidas a un proceso de lavado antes de ser adicionadas a las membranas. Interessantemente, las especies producidas por el desensamblado de las fibras inducidas por la CMT-3, no fueron capaces de alterar la permeabilidad de

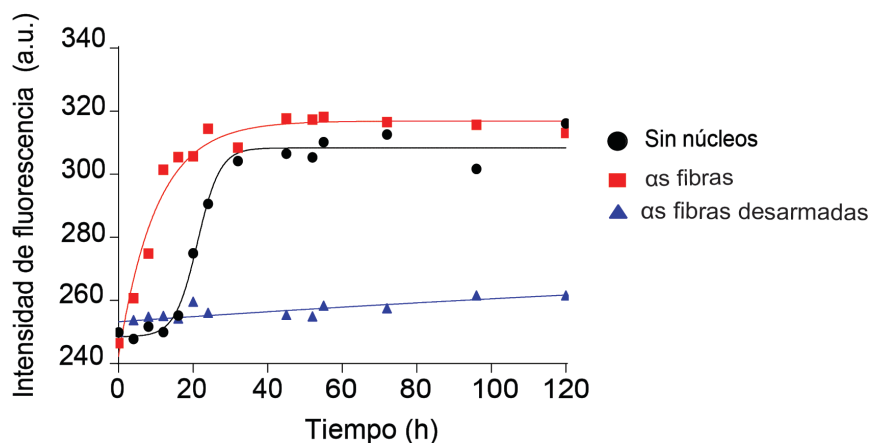


membrana sugiriendo que el tratamiento produce especies monoméricas o agregados incapaces de interaccionar y/o desestabilizar las bicapas lipídicas.



**Figura IV.4.9. Cambios en la permeabilidad de la membrana de vesículas.** Se prepararon oligómeros, fibras y fibras desensambladas de la  $\alpha$ -sinucleína bajo agitación orbital a 37 °C. La señal de fluorescencia se normalizó mediante la señal observada después de la adición del detergente Tritón X-100, que indujo la rotura completa de las vesículas. También se usó una solución monomérica de  $\alpha$ -sinucleína como control negativo.

Luego de estudiar la actividad en membranas sintéticas, es esencial evaluar si las especies obtenidas del desensamblado fibrilar inducido por la CMT-3 son capaces de servir como núcleos de polimerización. Para ello se utilizaron las fibras de  $\alpha$ -sinucleína y las especies obtenidas del desensamblado fibrilar como núcleos de polimerización de una solución fresca de  $\alpha$ -sinucleína monomérica. La Figura IV.4.10 muestra una cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína medida por espectroscopía de fluorescencia utilizando la sonda ThT. Se ve claramente que sólo las especies fibrilares pueden actuar como núcleos de polimerización de la  $\alpha$ -sinucleína monomérica, acortando su fase de latencia. Por el contrario, las especies provenientes del desensamblado de las fibras de  $\alpha$ -sinucleína por la CMT-3 no sólo no fueron capaces de alterar la fase de latencia, sino que todo el proceso de agregación resultó inhibido. Los resultados demuestran que especies resultantes del desensamblado de fibras amiloides maduras por parte de la CMT-3 no son capaces de alterar la permeabilidad de las vesículas lipídicas ni de actuar como núcleos de polimerización tienen grandes implicancias desde el punto de vista terapéutico.



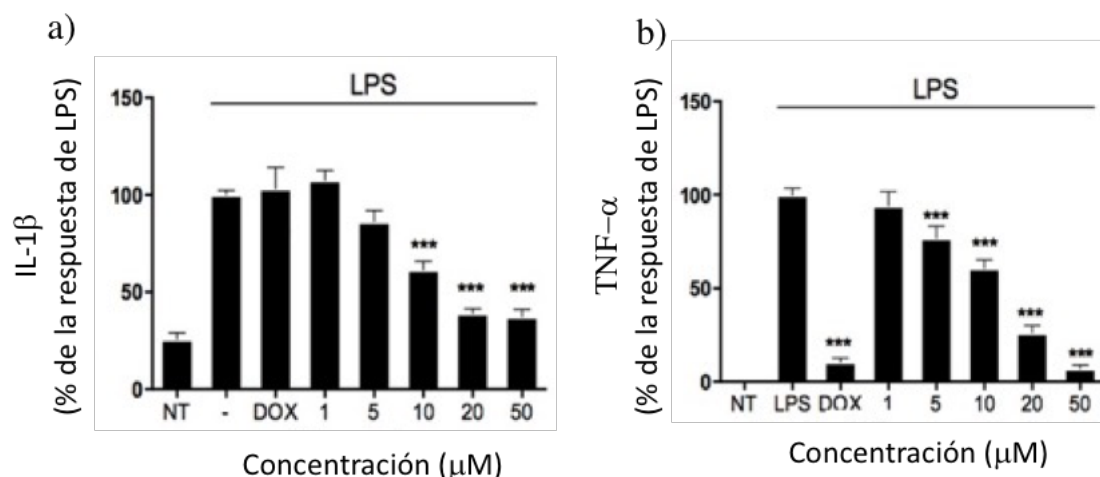
**Figura IV.4.10. Capacidad de los diferentes agregados de acelerar la polimerización.** Se incubaron soluciones de la  $\alpha$ -sinucleína monomérica en presencia de fibras (cuadrados rojos) o en presencia de fibras desensambladas (triángulos azules) a 37 °C bajo agitación orbital. La agregación se ensayó mediante la emisión de la fluorescencia de la sonda ThT. La cinética de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína incubada en ausencia de núcleos pre-incubados se muestra en círculos negros.

Luego de haber estudiado mediante diferentes técnicas biofísicas el poder anti-agregante de la CMT-3 sobre la proteína  $\alpha$ -sinucleína desde tiempo 0 h y producir el desensamblado de sus fibras, se analizó su poder anti-neuroinflamatorio.

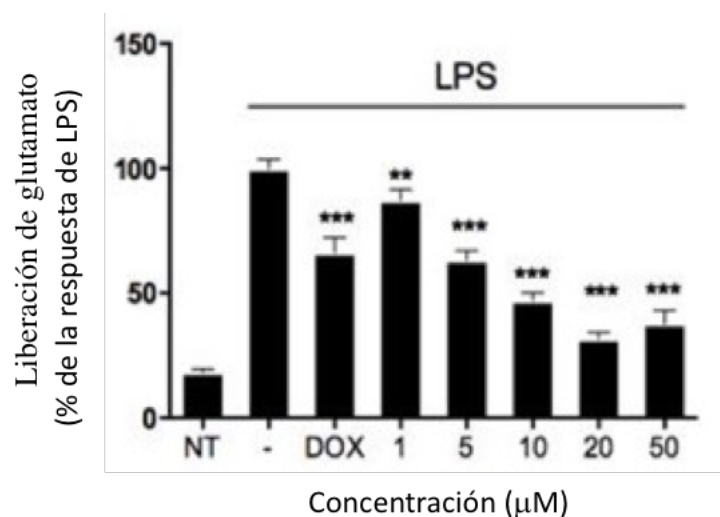
Como se mencionó anteriormente, la liberación de citoquinas proinflamatorias inducidas por agregados fibrilares, y por otras neurotoxinas, son uno de los elementos del círculo vicioso involucrado en la neurodegeneración. Considerando la actividad antiinflamatorios de las TC, se estudió el efecto de la CMT-3 sobre la liberación de citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo y la liberación de glutamato en modelos celulares de microglía.

Cultivos primarios de microglía de ratón fueron activados con LPS y se cuantificó la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Para llevar a cabo este ensayo, se adicionaron distintas concentraciones de la CMT-3 sobre cultivos celulares, y luego de 4 h de incubación se adicionó 10 ng/mL de LPS por 24 h, y por último, se cuantificó la liberación de las citoquinas mencionadas. La Figura IV.4.11. resume que el agregado de LPS produce una eficiente liberación de ambas citoquinas, valor que fue considerado como máximo para normalizar los resultados. El pre-tratamiento de las células con 50  $\mu$ M de la CMT-3 reduce a la mitad la liberación de estas especies indicando que la tetraciclina posee acción antiinflamatoria en la microglía. Por otro lado, se evaluó el efecto de 50  $\mu$ M doxiciclina sobre los cultivos de microglía y se pudo observar que no inhibe la liberación de IL-1 $\beta$  y

pero si inhibe la liberación de  $\text{TNF-}\alpha$ . De acuerdo con estos datos podemos concluir que la CMT-3 tiene mayor actividad antiinflamatoria que la doxyciclina.



**Figura IV.4.11. Efecto de la CMT-3 en cultivos primario de microglía.** Se incubó distintas concentraciones de la CMT-3 y 50  $\mu\text{M}$  de la doxyciclina en cultivos primario de microglía. Luego se activó las células con LPS y se midió la liberación de dos citoquinas diferentes a) IL-1 $\beta$  y b) TNF- $\alpha$ .



**Figura IV.4.12. Efecto de la CMT-3 en cultivos primario de microglía.** Se incubaron distintas concentraciones de la CMT-3 y 50  $\mu\text{M}$  de la doxyciclina en cultivos primario de microglía. Se midió la liberación glutamato al medio mediante ELISA.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC y se han reportado alteraciones en la homeostasis de este neurotransmisor en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (202). Las células de la microglía son reguladores críticos de la homeostasis del glutamato en el nivel de modulación de la actividad sináptica (203). Por esta razón, se determinó el efecto de la CMT-3 sobre la liberación de glutamato en cultivos de microglía. Para esto, se adicionaron diferentes concentraciones de la CMT-3 en cultivos celulares 2 h previas a la activación de las células con LPS y se

---

midió la liberación del neurotransmisor mediante técnicas de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Como se observa en la Figura IV.4.12, si se considera que LPS indujo una liberación del 100% del glutamato al medio en la condición control, la liberación se redujo al 50% en las células pre-tratadas con 20  $\mu$ M de CMT-3.

Estos resultados indicarían que la CMT-3 inhibiría la liberación del glutamato, inhibiendo así el proceso de estrés oxidativo generado por los LPS, y además se necesitarían concentraciones más bajas de la CMT-3 para lograr este efecto en comparación con la doxyciclina que se evaluó a una concentración de 50  $\mu$ M.

---

# *V. Discusión*

---

*“El mundo no sabe cuántos pensamientos y teorías que han pasado por la mente de un investigador científico han sido aplastados en silencio y en secreto por su propia crítica severa y su examen adverso”*

Michael Faraday

Los resultados obtenidos en los últimos años acerca de las bases moleculares de la neurodegeneración desarrollada en la enfermedad de Parkinson sugieren que estarían relacionadas con complejas interacciones genético-ambientales y, por lo tanto, más de un mecanismo puede llevar al proceso neurodegenerativo. De hecho, la agregación de las proteínas, la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la disrupción funcional mitocondrial y la disfunción lisosomal constituyen un círculo vicioso con consecuencias fatales para las neuronas (44).

Hasta ahora los esfuerzos dirigidos al desarrollo de nuevos fármacos para combatir la EP se centraron en atacar un blanco a la vez, por ejemplo, el glutatión para el proceso de estrés oxidativo, AFFITOPE actuando sobre el plegamiento de la  $\alpha$ -sinucleína, CERE-120 ayudando a restaurar y proteger las neuronas, entre otros. Sin embargo, esta táctica no parecería ser suficiente, por lo que una estrategia más atractiva sería el desarrollo de un fármaco o de una mezcla farmacológica que permita atacar varios blancos a la vez.

A pesar de los grandes esfuerzos invertidos en la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos detener o enlentecer la EP, hoy en día las terapias disponibles para esta patología son meramente paliativas. En efecto, los tratamientos farmacológicos disponibles sólo intervienen sobre los síntomas motores sin modificar el curso de la enfermedad. Una importante cantidad de moléculas obtenidas a partir de los protocolos tradicionales para el descubrimiento de nuevos fármacos demostraron poseer capacidad para bloquear el proceso patológico *in vitro* pero, cuando son trasladados a ensayos clínicos, fallan debido a su alta toxicidad o a su baja biodisponibilidad en el cerebro. Considerando que estos protocolos necesitan entre 10 y 17 años desde los estudios bioquímicos básicos hasta la aprobación regulatoria, enfoques alternativos como el reposicionamiento de fármacos adquieren relevancia ya que al usar medicamentos preexistentes con estudios preclínicos completos, los tiempos para su posicionamiento como indicación terapéutica disminuyen sensiblemente. En este contexto, el desafío actual es detectar en la farmacopea moléculas con propiedades antiagregantes, antiinflamatorias y antioxidantes, que puedan además cruzar la barrera hematoencefálica con la eficiencia necesaria para intervenir el proceso neurodegenerativo.

La estrategia de reposicionamiento de fármacos toma especial relevancia si se considera que, a pesar de que la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, su incidencia está creciendo más rápidamente que la Enfermedad de Alzheimer

(204). Considerando las proyecciones de crecimiento poblacional así como el aumento en la expectativa de vida de los países desarrollados, la cantidad de personas con diagnóstico de la EP será de alrededor de 14 millones en 2040. Esta cifra amenaza con quebrantar los sistemas de salud en todo el mundo si rápidamente no se resuelve terapéuticamente el problema de la neurodegeneración (204).

La doxiciclina, una tetraciclina de segunda generación, se usa actualmente como un antibiótico de amplio espectro en humanos que presentan antecedentes clínicos, y además tiene una buena penetración de la barrera hematoencefálica (205). Además de su efecto antibiótico bien caracterizado, la doxiciclina tiene otros efectos diferentes centrados principalmente en la influencia reguladora sobre la vía inflamatoria y el estrés oxidativo (206, 207). Es interesante destacar que, variando la concentración de la doxiciclina, es posible alternar entre la actividad antiinflamatoria o la antibiótica. De esta forma, algunos ensayos clínicos demostraron que la administración de 200-400 mg / día de doxiciclina posee el efecto antimicrobiano pero que puede llevar, a su vez, a desarrollar resistencia bacteriana y alteraciones endógenas orales. Por otro lado, la administración de la tetraciclina a dosis sub-antibióticas (20-40 mg/día) no altera la viabilidad bacteriana y ejerce actividades antiinflamatorias (208). También se describieron las propiedades neuroprotectoras de la doxiciclina en modelos de isquemia cerebral, de lesión de la médula espinal, de enfermedad de Parkinson, de enfermedad de Huntington, de esclerosis lateral amiotrófica, y de esclerosis múltiple (209, 210). Las propiedades antiinflamatorias de la doxiciclina se han propuesto como el mecanismo involucrado en el efecto neuroprotector. Sin embargo, el tratamiento con fármacos antiinflamatorios convencionales no demostró ser efectivo en neuroprotección, sugiriendo que este mecanismo por sí solo no sería suficiente (153).

En la presente Tesis demostramos un mecanismo adicional por el cual la doxiciclina podría ejercer un efecto neuroprotector, el cual actuaría en forma complementaria a los efectos antiinflamatorios (152, 208) y antioxidantes (207) ya descritos, posicionando esta molécula como una fármaco multidiana. Demostramos por primera vez que la doxiciclina es capaz de intervenir en el proceso patológico de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína induciendo una remodelación de los oligómeros a especies no tóxicas. Adicionalmente, los agregados formados en presencia de la tetraciclina no poseen la capacidad de actuar como núcleos de polimerización para la formación de fibras amiloides. Este proceso de remodelación es eficiente solo si ocurre en las etapas tempranas del proceso de agregación, ya que la adición de la doxiciclina una vez

consolidadas las fibras, no produce ningún cambio en la cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína o en su citotoxicidad. A partir de estos datos, llevamos adelante un estudio estructural sistemático para entender las bases moleculares que gobiernan este proceso. A partir de datos obtenidos por RMN, la doxiciclina es capaz de unirse a especies de  $\alpha$ -sinucleína oligoméricas, pero no a la proteína monomérica dejando libre a esta especie no tóxica para cumplir con su rol fisiológico (211). Es importante destacar que otras moléculas pequeñas conocidas en la bibliografía por intervenir el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína como Rojo Congo, Lacmoide y Galato de Epigallocatequina (EGCG) interactúan con la proteína monomérica (211, 212).

Estudios realizados utilizando microscopía electrónica de transmisión (MET) mostraron que la reacción de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de la doxiciclina forma especies oligoméricas que no evolucionan a fibras. Estos datos concordaron con los resultados obtenidos mediante espectroscopía de fluorescencia donde se observó que la formación de la estructura  $\beta$ -entrecruzada queda inhibida en presencia de la doxiciclina. El impacto de la doxiciclina en la formación de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína también se evidencia por los cambios en el tamaño y la forma de los agregados, como lo revelan los experimentos de SAXS. Además, las especies agregadas de la proteína formadas en presencia de la doxiciclina serían estructuralmente diferentes ya que exhiben una menor superficie hidrófoba en comparación con las muestras que no fueron tratadas con la tetraciclina, sugiriendo una disposición estructural diferente de la especie intermediaria. De hecho, los estudios de FT-IR demostraron la presencia de estructuras  $\beta$ -entrecruzadas paralelas en las especies formadas en presencia de la doxiciclina, en contraposición a los oligómeros formados en ausencia de la misma, que muestran estructuras  $\beta$ -entrecruzadas anti-paralelas. Las estructuras  $\beta$ -entrecruzadas anti-paralelas son estructuras típicas de las especies oligoméricas tóxicas de  $\alpha$ -sinucleína (23). Esta diferencia estructural, donde las especies que contienen estructuras  $\beta$ -entrecruzadas anti-paralelas está relacionada a la capacidad de hacer poros en la membrana lipídicas (23). En general, la diferente organización estructural de los oligómeros formados en presencia de la doxiciclina resulta en una menor capacidad para alterar la viabilidad celular y la permeabilidad de la membrana, en comparación con los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína.

En conjunto, todos estos resultados indican que la doxiciclina presenta características diferenciales frente a otras moléculas que interfieren con el proceso de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, como la baicaleína, el ácido gálico o la curcumina.



La baicaleína es un flavonoide activo que también induce la formación de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína inocuos, pero su uso como neuroprotector es controvertido ya que este flavonoide desencadena vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas (213). De la misma manera, el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) y algunos de sus derivados pueden interactuar con los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína por un mecanismo similar a la doxiciclina, es decir, detener el proceso de fibrilación mediante la formación de oligómeros no tóxicos, incapaces de ser utilizados como núcleos de polimerización para la  $\alpha$ -sinucleína monomérica (214). Sin embargo, no hay datos sobre biodisponibilidad o farmacocinética o efectos secundarios de este compuesto *in vivo*.

La curcumina (diferuloilmetano) también reduce significativamente la toxicidad celular de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína al unirse a oligómeros preformados y fibras (215) con una efectividad comparable con la doxiciclina (relación molar 1:1) (216). Sin embargo, la inestabilidad, la baja solubilidad y la poca biodisponibilidad de la curcumina limitan sus aplicaciones clínicas. Para superar este obstáculo, se han desarrollado algunos análogos estructurales a la curcumina con propiedades antiagregantes. Sin embargo, hasta ahora no se dispone de estudios clínicos de la toxicidad con análogos estructurales de curcumina (217). En este contexto, la doxiciclina presenta importantes ventajas sobre la curcumina y la baicaleína ya que su administración oral demostró ser eficiente alcanzado concentraciones plasmáticas de 2,6  $\mu\text{g/ml}$  a las 2 h. Además, es un fármaco seguro y eficaz para tratamientos dermatológicos de largo plazo (218, 219).

Se ha demostrado que las especies tóxicas de la  $\alpha$ -sinucleína pueden transmitirse desde células enfermas a neuronas sanas, donde inducen la conversión de  $\alpha$ -sinucleína nativa en especies oligoméricas tóxicas, siguiendo un mecanismo de nucleación-polimerización (220, 221). Es importante destacar que la doxiciclina entra sin dificultad al espacio intracelular, incluso al núcleo. Esta característica de la molécula es de gran importancia ya que de acuerdo a nuestros resultados, sugieren que las especies remodeladas estructuralmente con la doxiciclina anulan el proceso de polimerización y, por lo tanto, interferirían con el proceso de propagación. En efecto, los datos presentados en esta Tesis demuestran que la remodelación de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína hacia especies de menor toxicidad no tienen la capacidad de servir como núcleos de agregación, sugiriendo que la doxiciclina en el espacio extracelular podría también intervenir en el proceso de propagación-amplificación de las especies tóxicas.

En este contexto, la doxiciclina poseería cinco posibles blancos terapéuticos relacionados a la intervención de la progresión de la EP desactivando el círculo vicioso agregación-neuroinflamación-oxidación-agregación que genera la muerte neuronal. Teniendo además en cuenta que es un fármaco de administración oral y segura con buena biodisponibilidad en el SNC resulta oportuno proponerlo como candidato a Fase I de los ensayos clínicos de neuroprotección.

A pesar de las ventajas que la doxiciclina muestra sobre moléculas antiagregantes en la EP, su actividad antibiótica representa un obstáculo para tratamientos a largo plazo incluso a dosis sub-antibióticas. Esto motivó la búsqueda de un análogo estructural capaz de conservar las propiedades neuroprotectoras pero a la vez disminuir las propiedades antibióticas. Para avanzar en la búsqueda de este análogo, se identificó primero los determinantes estructurales de la actividad antiagregante de la molécula. Para ello se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura de diferentes antibióticos con capacidad inhibitoria de la agregación de diferentes proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas. La comparación de estos compuestos mediante algoritmos específicos nos permitió identificar la máxima subestructura común a todas ellas y el determinante común encontrado lo llamamos C $\beta$ -IM (Motivo de interacción  $\beta$ -entrecruzado). Es interesante destacar que el motivo contiene grupos dadores y aceptores de hidrógeno sobre una estructura plana separados por una distancia similar a los grupos dadores-aceptores que estabilizan la estructura  $\beta$ -entrecruzada. Considerando que estos grupos se encuentran localizados sobre una estructura “quasi-planar” representaría una distribución espacial óptima para competir y/o interferir con la formación de la estructura  $\beta$ -entrecruzada común a las estructuras amiloides.

El motivo C $\beta$ -IM fue utilizado para identificar en la familia de las tetraciclinas una subfamilia que contenga este determinante estructural. Posteriormente y teniendo en cuenta datos bibliográficos que demuestran que la actividad antibiótica de las tetraciclinas está relacionada a los grupos sustituyentes dimetilamino (146, 189), se refinó la búsqueda quedando sólo con el grupo denominado tetraciclinas modificadas químicamente (CMTs). De esta familia se seleccionó CMT-3, ya que la misma cumple con ciertas propiedades fisicoquímicas que debe presentar una molécula para poder atravesar la barrera hematoencefálica, además de tener estudios preclínicos completos que permiten la molécula se encuentre en fase II en estudios clínicos como inhibidor de la metástasis

de tumores cerebrales(197). Estos estudios además aseguran una buena biodisponibilidad de CMT-3 en el SNC, característica esencial para su reposicionamiento.

En concordancia con las predicciones basadas en la presencia del motivo C $\beta$ -IM, se demostró mediante espectroscopía de fluorescencia la capacidad de la CMT-3 de inhibir la reacción de agregación de la  $\alpha$ -sinucleína. Los estudios dosis-respuesta realizados demuestran que la CMT-3 es más eficiente que la doxiciclina como antiagregante ya que fueron necesarias concentraciones más bajas para inhibir la formación de estructuras  $\beta$ -entrecruzadas. Sin embargo, si bien la intensidad de la fluorescencia de la sonda ThT no aumenta durante la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en presencia de CMT-3, no se puede descartar la formación de especies oligoméricas ya que PID como  $\alpha$ -sinucleína o A $\beta$  forman especies oligoméricas no detectadas por esta sonda. Esto se vio reflejado en las microscopías electrónicas donde se observó la presencia de especies oligoméricas a las 16 h de incubación en ambas condiciones. Sin embargo, en presencia de la CMT-3 estos agregados se estabilizan y no evolucionan hacia fibras maduras.

Teniendo en cuenta las imágenes obtenidas por las diferentes microscopías electrónicas, utilizamos técnicas alternativas que nos permitieron demostrar la presencia de especies de mayor tamaño durante la reacción de agregación amiloide de la  $\alpha$ -sinucleína. En efecto, técnicas de turbidimetría y de dispersión estática de la luz demostraron la presencia de estas especies, pero además demostraron que las cinéticas de agregación de en presencia y en ausencia de la CMT-3 son diferentes. Desde un punto de vista estructural, un análisis comparativo de los espectros de FT-IR revela que los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína formados en ausencia o en presencia de las tetraciclinas (la doxiciclina o la CMT-3) presentan arreglos de estructura secundaria distintos.

De acuerdo a la bibliografía previa, la teoría que las fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína son inertes, es decir, que no causan ningún efecto en el entorno celular estaría siendo discutida ya que se pudo observar en diferentes estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que las especies fibrilares son las responsables de la activación de la microglía (201, 222). Por esta razón, se ensayó la capacidad de la CMT-3 en el proceso de desensamblado de las fibras amiloides preformadas de  $\alpha$ -sinucleína. Los resultados obtenidos claramente muestran que, a diferencia de la doxiciclina, la CMT-3 tiene la capacidad de remodelar fibras preformadas luego de 44 h de incubación. Utilizando microscopía confocal de fluorescencia se siguió la disminución de la emisión de la sonda

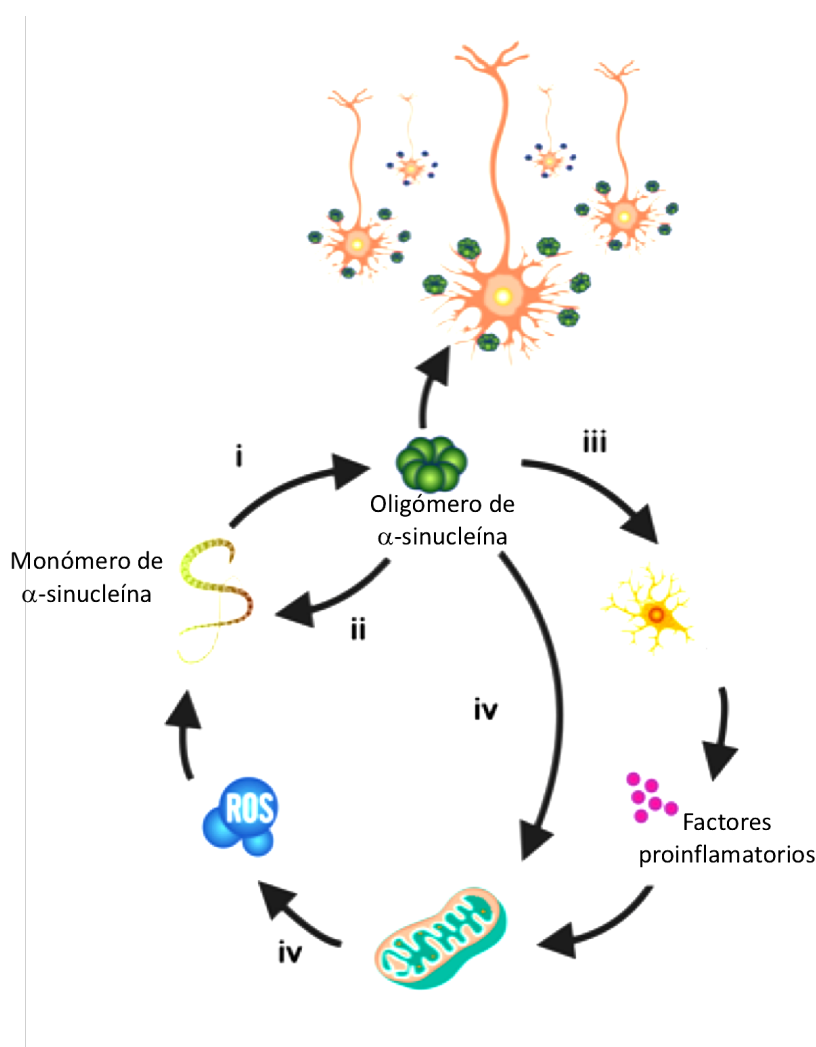
ThS que se traduce como una disminución en la cantidad de estructura  $\beta$ -entrecruzada pero también como algún tipo de apantallamiento inespecífico de la sonda fluorescente. Para interpretar correctamente este proceso, se recurrió a diferentes técnicas de microscopía donde el proceso de desensamblado quedó claramente demostrado. En efecto, en todas las imágenes analizadas, la presencia de la CMT-3 genera una significativa disminución de la cantidad de aglomerados de las fibras, así como un claro acortamiento de las fibras remanentes al final de estudio.

El proceso de desensamblado también se estudió sobre el péptido A $\beta$  (223) dando como resultado especies más tóxicas que las fibras formadas en el proceso de agregación del péptido. A diferencia de nuestros resultados las especies producto del desensamblado no fueron capaces de producir una perturbación de las membranas sintéticas. Otro fármaco que tiene la capacidad de desestabilizar las fibras formadas de  $\alpha$ -inucleína es la Rifampicina. Este antibiótico no sólo tiene la capacidad de inhibir la formación de las fibras amiloides como los otros compuestos mencionados, sino que también tiene la capacidad de disminuir la cantidad de estructura  $\beta$ -entrecruzada. En este caso, la Rifampicina interactúa con los oligómeros solubles llevando el proceso de agregación por otra vía no amiloidogénica, y además interacciona con las especies monoméricas de la proteína de tal forma que podría afectar su función biológica (224). A pesar de que la Rifampicina tiene el mismo efecto que la CMT-3 sobre las fibras, las diferencias entre la CMT-3 y la Rifampicina es que la CMT-3 posee modificaciones químicas que eliminaron su actividad antibiótica, por lo tanto, sería un mejor candidato para su reposicionamiento en la clínica.

Como se mencionó anteriormente el EGCG es capaz de inhibir la formación de los oligómeros tóxicos de  $\alpha$ -sinucleína, llevándolo a la formación de oligómeros no tóxicos (211). Sin embargo, estos oligómeros no tóxicos aceleran la formación de fibras amiloides de la  $\alpha$ -sinucleína, representando así un inconveniente para su uso en el tratamiento de la EP ya que serían estas especies las responsables del proceso neuroinflamatorio (225). Esto se diferencia de nuestro sistema de estudio, ya que las especies agregadas formadas en presencia de la doxiciplina y CMT-3, no son capaces de actuar como núcleos de polimerización.

Las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de un compuesto son de gran relevancia ya que pueden inhibir la activación de las células de la microglía, previniendo de este modo la formación de especies reactivas del oxígeno y por

consiguiente un estrés oxidativo. Al igual que la doxiciclina (152), nuestros resultados muestran que la CMT-3 tiene capacidad antiinflamatoria inhibiendo la producción de dos citoquinas pro-inflamatorias IL-1B y TNF- $\alpha$ , sin embargo, las concentraciones necesarias para alcanzar los efectos inhibitorios con la CMT-3 son menores a las utilizadas con la doxiciclina, convirtiéndola a la CMT-3 en una molécula más eficiente en su función como antiinflamatorio. Además, se observó una inhibición de la liberación de glutamato indicando que la CMT-3 es capaz de impedir el estrés oxidativo en las células. Esto es de gran importancia para el ambiente celular ya que este neurotransmisor puede resultar tóxico tanto para la microglía como para las células que se encuentran en su entorno, como son las células neuronales.



**Figura V.1. Diagrama esquemático de la retroalimentación entre la proteína  $\alpha$ -sinucleína, las mitocondrias y las células gliales.** Las especies oligoméricas de la  $\alpha$ -sinucleína provocan la fragmentación de las mitocondrias y aumentan la producción de ROS. El ROS tiene un impacto sobre la  $\alpha$ -sinucleína monomérica que desencadena su agregación. Los oligómeros de la  $\alpha$ -sinucleína liberados a la matriz extracelular inducen la activación de la glía. La liberación de factores pro-inflamatorios induce daño mitocondrial en un ciclo sin fin. La doxiciclina y la CMT-3 pueden interferir con este círculo vicioso bloqueando (i) la nucleación de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, (ii) la reacción de nucleación-polimerización, (iii) la activación de la glía (151), y (iv) la actividad de ROS (206).

En su conjunto, nuestros resultados indican que, tanto la presencia de doxiciclina como la de CMT-3, puede atenuar el ciclo patológico de la EP esquematizado en la Figura V.1 en varios puntos: inhibición de la agregación, atenuación de la propagación de  $\alpha$ -sinucleína, neuroinflamación en células gliales, disfunción mitocondrial y daño de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Como se mencionó anteriormente en este trabajo de Tesis, un gran problema en la actualidad es que los tratamientos actuales utilizados para combatir la enfermedad de Parkinson no son capaces de detener la neurodegeneración, sino que son tratamientos de carácter paliativo. Es importante destacar que el efecto antiinflamatorio no es suficiente para actuar como neuroprotector. Esto se pudo comprobar mediante ensayos clínicos utilizando la minociclina donde se evaluó su capacidad para ser reposicionada como tratamiento en la EP por su gran actividad antiinflamatoria, sin embargo, no tuvo éxito.

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis revelan posibles efectos neuroprotectores para las dos tetraciclinas estudiadas, sin embargo, proponemos a la CMT-3 para su reutilización y reposicionamiento para ser usado en la Enfermedad de Parkinson ya que no posee actividad antibiótica. Además, este compuesto puede actuar no solo inhibiendo la formación de fibras amiloides de la  $\alpha$ -sinucleína, sino que también es capaz de desestabilizar las fibras pre-formadas llevándolas a fibras de menor tamaño o proto-fibras. Estas proto-fibras no serían capaces de alterar la permeabilidad de las membranas. Además, poseen una excelente actividad antiinflamatoria. Estas tres características son de gran importancia, ya que una sola molécula podría actuar, como se mencionó anteriormente, sobre diferentes blancos al mismo tiempo. En resumen, teniendo en cuenta la problemática que conlleva la EP *proponemos la reutilización y el reposicionamiento de la CMT-3 para tratar la EP*. Aunque las pruebas clínicas a la fecha sobre su biodisponibilidad y su seguridad no son exhaustivas como las del tratamiento con la doxiciclina, su capacidad de actuar en diferentes procesos que se desarrollan durante la enfermedad la convierte en una molécula ideal para ingresar en la etapa de ensayos clínicos.

---

# *VI. Conclusiones*

---

*“El objetivo de la medicina es prevenir las enfermedades y prolongar la vida, el ideal de la medicina es eliminar la necesidad de un médico”*

William James Mayo

---

Las conclusiones de la presente Tesis se resumen a continuación:

- Se comprobó que la doxiciclina inhibe la formación de fibras amiloides. Al interaccionar con las especies agregadas de la proteína  $\alpha$ -sinucleína se producen cambios conformacionales que llevan a la formación de oligómeros estructuralmente diferentes y no tóxicos.
- Se identificó los determinantes estructurales que le confieren actividad anti-agregante a la doxiciclina. Esto permitió identificar a CMT-3, fármaco sin actividad antibiótica, como candidato con capacidad anti-agregante.
- Se comprobó experimentalmente la capacidad de la CMT-3 para inhibir la formación de agregados fibrilares. Los oligómeros formados son estructuralmente diferentes a los oligómeros canónicos y a los oligómeros formados en presencia de la doxiciclina.
- La CMT-3 es capaz de actuar en el proceso de desensamblado de las fibras amiloides pre-formadas. Las especies resultantes de este tratamiento no presentan capacidad de alterar la permeabilidad de las membranas y no son capaces de actuar como núcleos de polimerización, inhibiendo así el proceso de nucleación-polimerización.
- La CMT-3 es a nuestro entender la molécula más adecuada para su reposicionamiento en la EP y posiblemente en otras sinucleinopatías.



---

# *VII. Difusión de resultados*

---

*“Conocer, descubrir, publicar, ese es el destino de un científico”*

François Arago

Parte de los resultados del siguiente trabajo de tesis dieron lugar a las publicaciones y a las presentaciones en congresos científicos que se detallan a continuación:

**“Repurposing doxycycline for synucleinopathies: remodelling of  $\alpha$ -synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species”.**

González-Lizárraga, F., Socías, S. B., Ávila, C. L., Torres-Bugeau, C. M., Barbosa, L. R. S., Binolfi, A., Sepúlveda-Díaz, J. E., Del-Bel, E., Fernandez, C. O., Papy-Garcia, D., Itri, R., Raisman-Vozari, R., and Chehín, R. N. (2017) *Scientific Reports*. **7**, 41755

**“Lessons learned from protein aggregation: toward technological and biomedical applications”.** Avila, C. L., Chaves, S., Socias, S. B., Vera-Pingitore, E., González-Lizárraga, F., Vera, C., Ploper, D., and Chehín, R. (2017) *Biophysical. Reviews*. **9**, 501–515.

**“Repurposing antibiotics against amyloid aggregation in neurodegenerative diseases”.** Socias, S. B., González-Lizárraga, F., Avila, C. L., Vera, C., Acuña, L., Sepulveda-Díaz, J. E., Del-Bel, E., Raisman-Vozari, R., and Chehin, R. N. (2018) Exploiting the therapeutic potential of ready-to-use drugs: *Progress in Neurobiology*. **162**, 17–36

**“Microglial glutamate release evoked by  $\alpha$ -synuclein aggregates is prevented by dopamine”.** Dos-Santos-Pereira, M., Acuña, L., Hamadat, S., Rocca, J., González-Lizárraga, F., Chehín, R., Sepulveda-Díaz, J., Del-Bel, E., Raisman-Vozari, R., and Michel, P. P. (2018). *Glia*. **66**, 2353–2365.

**“Doxycycline leads to the formation of off-pathway non toxic alpha-Synuclein oligomers”.** María Florencia González Lizarraga; Clarisa Torres-Bogeu; Benjamín Socías; Cesar Luis Avila; Leandro Barbosa; Rosangela Itri; Dulce Papy-Garcia; Rita Raisman-Vozari; Rosana Chehín. Sociedad Argentina de Biofísica. Año: 2014;

**“Doxycycline modifies alpha-synuclein aggregation pathway yielding a lacking toxicity novel oligomeric species”.** Maria Florencia Gonzalez Lizarraga; Benjamín Socías; Cesar Luis Avila; Clarisa Torres - Bogueau; Leandro Barbosa; Andres Binolfi; Claudio Fernandez; Rosangela Itri; Dulce Papy-Garcia; Rita Raisman-Vozari; Rosana Chehín . XXX Congreso Anual De La Sociedad Argentina De Investigacion En Neurociencias . Año: 2015;

**“New therapeutic perspective for Parkinsons disease: Doxycycline inhibits the formation of  $\alpha$ -synuclein toxic species”.** Florencia González Lizárraga; Sergio B. Socías; César L. Ávila; Clarisa M. Torres-Bugeau; Leandro R. S. Barbosa; Andres Binolfi; Rosangela Itri; Julia Sepulveda-Díaz; Dulce Papy- Garcia ; Rosana N. Chehín; Rita Raisman-Vozari. 10 th FENS Forum of Neuroscience. Año: 2016;

**“Repurposing tetracyclines for treatment of Synucleinopathies”.** Florencia Gonzalez Lizarraga; Benjamín Socías; Cesar Luis Avila; Clarisa M. Torres-Bugeau; Leandro Barbosa; Andres Binolfi; Claudio O. Fernandez; Dulce Papy-Garcia; Julia E. Sepúlveda-Díaz; Rita Raisman-Vozari; Rosana Chehín. 2nd Federation of Latinoamerican and Caribbean Neuroscience Societies. Año: 2016;

---

**“Doxycycline can efficiently switch alpha-synuclein early aggregation oligomers into non-toxic species: repurposing an old drug as neuroprotector”.** F. Gonzalez Lizarraga; B. Socías ; C. Avila; L. Barbosa; B. Andres; J. Sepulveda Diaz; D.B. Elaine; C. Fernandez; D. Papy-Garcia; R. Chehin ; R. Raisman-Vozari. Neurotoxicity Society. Año: 2017.

**“Chemically modified tetracycline (CMT) inhibits alpha-synuclein amyloid fibers formation and neuroinflammation”.** Florencia Gonzalez Lizarraga; Sergio Socías; César Ávila; Diego Ploper; Nour Francis; Lia Pietrasanta; Rita Raisman-Vozari; Rosana Chehín. Society for Neuroscience. Año: 2018;

**“Chemically modified tetracycline CMT-3 inhibits alpha-synuclein aggregation and toxicity: a possible ready to use neuroprotector”.** Florencia Gonzalez Lizarraga; Sergio Socías; César Ávila; Diego Ploper; Nour Francis; Rita Raisman-Vozari; Lia Pietrasanta; Rosana Chehín. Sociedad Argentina de Biofísica. Año: 2018;

---

# *VIII. Bibliografía*

---

*“Si he llegado a ver más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes”.*

Sir Isaac Newton

1. Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D., Iakoucheva, L. M., and Obradović, Z. (2002) Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*. **41**, 6573–82
2. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197–208
3. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 15–22
4. Pace, C. N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 14–7
5. Lu, D., and Liu, Z. (2010) Studies of protein folding pathways. *Annu. Reports Sect. "C" (Physical Chem.* **106**, 259
6. Clark, P. L. (2004) Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 527–34
7. Jahn, T. R., and Radford, S. E. (2005) The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.* **272**, 5962–70
8. Avila, C. L., Chaves, S., Socias, S. B., Vera-Pingitore, E., González-Lizárraga, F., Vera, C., Ploper, D., and Chehín, R. (2017) Lessons learned from protein aggregation: toward technological and biomedical applications. *Biophys. Rev.* **9**, 501–515
9. Levine, Z. A., Larini, L., LaPointe, N. E., Feinstein, S. C., and Shea, J.-E. (2015) Regulation and aggregation of intrinsically disordered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2758–63
10. Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2003) Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*. **424**, 805–8
11. Caughey, B., and Lansbury, P. T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267–98
12. Fändrich, M. (2007) On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2066–78
13. Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N., and Fändrich, M. (2009) Aβ(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **386**, 869–77
14. Kodali, R., and Wetzel, R. (2007) Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 48–57
15. Cohen, A. S., and Calkins, E. (1959) Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*. **183**, 1202–3
16. Gueft, B., and Ghidoni, J. J. (1963) The site of formation and ultrastructure of amyloid. *Am. J. Pathol.* **43**, 837–54
17. Shirahama, T., and Cohen, A. S. (1967) High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J. Cell Biol.* **33**, 679–708
18. Pauling, L., and Corey, R. B. (1951) Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **37**, 729–40
19. Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., and Radford, S. E. (2018) A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 755–773
20. Oberg, K., Chrnyk, B. A., Wetzel, R., and Fink, A. L. (1994) Nativelike secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. *Biochemistry*. **33**, 2628–34
21. Ávila, C. L., Torres-Bugeau, C. M., Barbosa, L. R. S., Sales, E. M., Ouidja, M. O.,

- Socías, S. B., Celej, M. S., Raisman-Vozari, R., Papy-Garcia, D., Itri, R., and Chehín, R. N. (2014) Structural characterization of heparin-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protofibrils preventing  $\alpha$ -synuclein oligomeric species toxicity. *J. Biol. Chem.* **289**, 13838–50
22. Torres-Bugeau, C. M., Ávila, C. L., Raisman-Vozari, R., Papy-Garcia, D., Itri, R., Barbosa, L. R. S., Cortez, L. M., Sim, V. L., and Chehín, R. N. (2012) Characterization of heparin-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase early amyloid-like oligomers and their implication in  $\alpha$ -synuclein aggregation. *J. Biol. Chem.* **287**, 2398–409
  23. Celej, M. S., Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Fidelio, G. D., Ruyschaert, J.-M., and Raussens, V. (2012) Toxic prefibrillar  $\alpha$ -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel  $\beta$ -sheet structure. *Biochem. J.* **443**, 719–26
  24. Zandomenighi, G., Krebs, M. R. H., McCammon, M. G., and Fändrich, M. (2004) FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci.* **13**, 3314–21
  25. Ashburn, T. T., Han, H., McGuinness, B. F., and Lansbury, P. T. (1996) Amyloid probes based on Congo Red distinguish between fibrils comprising different peptides. *Chem. Biol.* **3**, 351–8
  26. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* **177**, 244–9
  27. Hardesty, B., and Kramer, G. (2001) Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **66**, 41–66
  28. Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* **92**, 351–66
  29. Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* **295**, 1852–8
  30. Kaufman, R. J., Scheuner, D., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C. Y., and Arnold, S. M. (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 411–21
  31. Hammond, C., and Helenius, A. (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 523–9
  32. Schubert, U., Antón, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature.* **404**, 770–4
  33. Dobson, C. M. (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**, 133–45
  34. Bullock, A. N., and Fersht, A. R. (2001) Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer.* **1**, 68–76
  35. Horwich, A. (2002) Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J. Clin. Invest.* **110**, 1221–32
  36. Tan, S. Y., and Pepys, M. B. (1994) Amyloidosis. *Histopathology.* **25**, 403–14
  37. Kelly, J. W. (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 101–6
  38. Bronstein, J. M., Tagliati, M., Alterman, R. L., Lozano, A. M., Volkmann, J., Stefani, A., Horak, F. B., Okun, M. S., Foote, K. D., Krack, P., Pahwa, R., Henderson, J. M., Hariz, M. I., Bakay, R. A., Rezai, A., Marks, W. J., Moro, E., Vitek, J. L., Weaver, F. M., Gross, R. E., and DeLong, M. R. (2011) Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch. Neurol.* **68**, 165

39. Uversky, V. N. (2008) Alpha-synuclein misfolding and neurodegenerative diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 507–40
40. Twelves, D., Perkins, K. S. M., and Counsell, C. (2003) Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **18**, 19–31
41. Ascherio, A., and Schwarzschild, M. A. (2016) The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet. Neurol.* **15**, 1257–1272
42. Lees, A. J., Selikhova, M., Andrade, L. A., and Duyckaerts, C. (2008) The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov. Disord.* **23**, 777–83
43. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., and Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.* **416**, 507–11
44. Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., and Lang, A. E. (2017) Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17013
45. Jakes, R., Spillantini, M. G., and Goedert, M. (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* **345**, 27–32
46. Barbour, R., Kling, K., Anderson, J. P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., Fox, M., Goldstein, J. M., Soriano, F., Seubert, P., and Chilcote, T. J. (2008) Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener. Dis.* **5**, 55–9
47. Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., and Browne, G. (2001) Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* **307**, 1061–73
48. Uversky, V. N., Gillespie, J. R., and Fink, A. L. (2000) Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins.* **41**, 415–27
49. Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., and George, J. M. (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **273**, 9443–9
50. Sung, Y.-H., and Eliezer, D. (2006) Secondary structure and dynamics of micelle bound beta- and gamma-synuclein. *Protein Sci.* **15**, 1162–74
51. Drin, G., and Antonny, B. (2010) Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett.* **584**, 1840–7
52. Bertoncini, C. W., Jung, Y.-S., Fernandez, C. O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T. M., and Zweckstetter, M. (2005) Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1430–5
53. Middleton, E. R., and Rhoades, E. (2010) Effects of curvature and composition on  $\alpha$ -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys. J.* **99**, 2279–88
54. Jensen, M. B., Bhatia, V. K., Jao, C. C., Rasmussen, J. E., Pedersen, S. L., Jensen, K. J., Langen, R., and Stamou, D. (2011) Membrane curvature sensing by amphipathic helices: a single liposome study using  $\alpha$ -synuclein and annexin B12. *J. Biol. Chem.* **286**, 42603–14
55. Gitler, A. D., Bevis, B. J., Shorter, J., Strathearn, K. E., Hamamichi, S., Su, L. J., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., Rochet, J.-C., McCaffery, J. M., Barlowe, C., and Lindquist, S. (2008) The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 145–50
56. Chua, C. E. L., and Tang, B. L. (2011) Rab, SNAREs and  $\alpha$ -synuclein--membrane trafficking defects in synucleinopathies. *Brain Res. Rev.* **67**, 268–81
57. Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O. M., and Südhof, T.



- C. (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*. **123**, 383–96
58. Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **20**, 3214–20
  59. Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., and Rosenthal, A. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. **25**, 239–52
  60. Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S., and Jäkälä, P. (2004) Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *J. Neurosci.* **24**, 11165–70
  61. Peng, X., Peng, X. M., Tehranian, R., Dietrich, P., Stefanis, L., and Perez, R. G. (2005) Alpha-synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J. Cell Sci.* **118**, 3523–30
  62. Klein, J., Chalifa, V., Liscovitch, M., and Löffelholz, K. (1995) Role of phospholipase D activation in nervous system physiology and pathophysiology. *J. Neurochem.* **65**, 1445–55
  63. Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B., and Morris, A. J. (1998) Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*. **37**, 4901–9
  64. Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., and Masliah, E. (2000) alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am. J. Pathol.* **157**, 401–10
  65. Kamp, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., Eimer, S., Winklhofer, K. F., and Haass, C. (2010) Inhibition of mitochondrial fusion by  $\alpha$ -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J.* **29**, 3571–89
  66. Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., Sesaki, H., Cheng, Y., Finkbeiner, S., Nussbaum, R. L., Masliah, E., and Edwards, R. H. (2011) Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* **286**, 20710–26
  67. Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. **388**, 839–40
  68. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., and Nussbaum, R. L. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. **276**, 2045–7
  69. Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., and Lansbury, P. T. (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 571–6
  70. Karpinar, D. P., Balija, M. B. G., Kügler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.-Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B. H., Heise, H., Kumar, A., Riedel, D., Fichtner, L., Voigt, A., Braus, G. H., Giller, K., Becker, S., Herzig, A., Baldus, M., Jäckle, H., Eimer, S., Schulz, J. B., Griesinger, C., and



- Zweckstetter, M. (2009) Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J.* **28**, 3256–68
71. Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., and Riek, R. (2011) In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4194–9
  72. Pratt, M. R., Abeywardana, T., and Marotta, N. P. (2015) Synthetic Proteins and Peptides for the Direct Interrogation of  $\alpha$ -Synuclein Posttranslational Modifications. *Biomolecules.* **5**, 1210–27
  73. Alonso-Canovas, A., Katschnig, P., Tucci, A., Carecchio, M., Wood, N. W., Edwards, M., Martínez Castrillo, J. C., Burke, D., Heales, S., and Bhatia, K. P. (2010) Atypical parkinsonism with apraxia and supranuclear gaze abnormalities in type 1 Gaucher disease. Expanding the spectrum: case report and literature review. *Mov. Disord.* **25**, 1506–9
  74. Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2015) Proteostasis and aging. *Nat. Med.* **21**, 1406–15
  75. Xilouri, M., Brekk, O. R., and Stefanis, L. (2013)  $\alpha$ -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol. Neurobiol.* **47**, 537–51
  76. Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* **216**, 136–44
  77. Ma, J., Wollmann, R., and Lindquist, S. (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science.* **298**, 1781–5
  78. Prusiner, S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science.* **252**, 1515–22
  79. Eraña, H., Venegas, V., Moreno, J., and Castilla, J. (2017) Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 1125–1136
  80. Reyes, J. F., Olsson, T. T., Lamberts, J. T., Devine, M. J., Kunath, T., and Brundin, P. (2015) A cell culture model for monitoring  $\alpha$ -synuclein cell-to-cell transfer. *Neurobiol. Dis.* **77**, 266–75
  81. Lee, H.-J., Suk, J.-E., Bae, E.-J., and Lee, S.-J. (2008) Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 423–8
  82. Lee, H.-J., Suk, J.-E., Patrick, C., Bae, E.-J., Cho, J.-H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., and Lee, S.-J. (2010) Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* **285**, 9262–72
  83. Cavaliere, F., Cerf, L., Dehay, B., Ramos-Gonzalez, P., De Giorgi, F., Bourdenx, M., Bessede, A., Obeso, J. A., Matute, C., Ichas, F., and Bezard, E. (2017) In vitro  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity and spreading among neurons and astrocytes using Lewy body extracts from Parkinson disease brains. *Neurobiol. Dis.* **103**, 101–112
  84. Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., and Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* **24**, 197–211
  85. Berg, D., Postuma, R. B., Adler, C. H., Bloem, B. R., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., Goetz, C. G., Halliday, G., Joseph, L., Lang, A. E., Liepelt-Scarfone, I., Litvan, I., Marek, K., Obeso, J., Oertel, W., Olanow, C. W., Poewe, W., Stern, M., and Deuschl, G. (2015) MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov.*

- Disord.* **30**, 1600–11
86. Mahlknecht, P., Seppi, K., and Poewe, W. (2015) The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. *J. Parkinsons. Dis.* **5**, 681–97
  87. George, S., Rey, N. L., Reichenbach, N., Steiner, J. A., and Brundin, P. (2013)  $\alpha$ -Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol.* **23**, 350–7
  88. Halliday, G. M., and McCann, H. (2010) The progression of pathology in Parkinson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1184**, 188–95
  89. Tyson, T., Steiner, J. A., and Brundin, P. (2016) Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology. *J. Neurochem.* **139 Suppl**, 275–289
  90. Mao, X., Ou, M. T., Karuppagounder, S. S., Kam, T.-I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G. E., Brahmachari, S., Shin, J.-H., Kang, H. C., Zhang, J., Xu, J., Chen, R., Park, H., Andrabi, S. A., Kang, S. U., Gonçalves, R. A., Liang, Y., Zhang, S., Qi, C., Lam, S., Keiler, J. A., Tyson, J., Kim, D., Panicker, N., Yun, S. P., Workman, C. J., Vignali, D. A. A., Dawson, V. L., Ko, H. S., and Dawson, T. M. (2016) Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science*. 10.1126/science.aah3374
  91. Hansen, C., Angot, E., Bergström, A.-L., Steiner, J. A., Pieri, L., Paul, G., Outeiro, T. F., Melki, R., Kallunki, P., Fog, K., Li, J.-Y., and Brundin, P. (2011)  $\alpha$ -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 715–25
  92. Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., and Lee, S.-J. (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13010–5
  93. Marques, O., and Outeiro, T. F. (2012) Alpha-synuclein: From secretion to dysfunction and death. *Cell Death Dis.* **3**, e350-7
  94. Danzer, K. M., Haasen, D., Karow, A. R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* **27**, 9220–32
  95. Danzer, K. M., Krebs, S. K., Wolff, M., Birk, G., and Hengerer, B. (2009) Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J. Neurochem.* **111**, 192–203
  96. Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* **30**, 6838–51
  97. Hoffmann, A.-C. C. A., Ettle, B., Bruno, A., Kulinich, A., Hoffmann, A.-C. C. A., von Wittgenstein, J., Winkler, J., Xiang, W., and Schlachetzki, J. C. M. M. (2016) Alpha-synuclein activates BV2 microglia dependent on its aggregation state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **479**, 881–886
  98. Reynolds, A. D., Glanzer, J. G., Kadiu, I., Ricardo-Dukelow, M., Chaudhuri, A., Ciborowski, P., Cerny, R., Gelman, B., Thomas, M. P., Mosley, R. L., and Gendelman, H. E. (2008) Nitrated alpha-synuclein-activated microglial profiling for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **104**, 1504–25
  99. Cremades, N., Cohen, S. I. A., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R. W., Dunne, P., Aprile, F. A., Bertoncini, C. W., Wood, N. W., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., and Klenerman, D. (2012) Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of  $\alpha$ -synuclein. *Cell*. **149**, 1048–59

100. Fauvet, B., Mbefo, M. K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M. T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., Eliezer, D., Moore, D. J., Schneider, B., Aebischer, P., El-Agnaf, O. M., Masliah, E., and Lashuel, H. A. (2012)  $\alpha$ -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **287**, 15345–64
101. Moehle, M. S., and West, A. B. (2015) M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience*. **302**, 59–73
102. Ransohoff, R. M. (2016) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. **353**, 777–83
103. Hirsch, E. C., and Hunot, S. (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet. Neurol.* **8**, 382–97
104. Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Przuntek, H., and Riederer, P. (1995) Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* **202**, 17–20
105. Stypuła, G., Kunert-Radek, J., Stepień, H., Zylńska, K., and Pawlikowski, M. Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation*. **3**, 131–4
106. Béraud, D., Twomey, M., Bloom, B., Mittereder, A., Ton, V., Neitzke, K., Chasovskikh, S., Mhyre, T. R., and Maguire-Zeiss, K. A. (2011)  $\alpha$ -Synuclein Alters Toll-Like Receptor Expression. *Front. Neurosci.* **5**, 80
107. Couch, Y., Alvarez-Erviti, L., Sibson, N. R., Wood, M. J. A., and Anthony, D. C. (2011) The acute inflammatory response to intranigral  $\alpha$ -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *J. Neuroinflammation*. **8**, 166
108. Müller, T. (2015) Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs*. **75**, 157–74
109. Fox, S. H., Katzenschlager, R., Lim, S.-Y., Ravina, B., Seppi, K., Coelho, M., Poewe, W., Rascol, O., Goetz, C. G., and Sampaio, C. (2011) The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **26 Suppl 3**, S2-41
110. Ferreira, J. J., Lees, A., Rocha, J.-F., Poewe, W., Rascol, O., Soares-da-Silva, P., and Bi-Park 1 investigators (2016) Opicapone as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and end-of-dose motor fluctuations: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet. Neurol.* **15**, 154–165
111. Schapira, A. H. V (2011) Monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease: a review of symptomatic and potential disease-modifying effects. *CNS Drugs*. **25**, 1061–71
112. Jankovic, J., and Poewe, W. (2012) Therapies in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* **25**, 433–47
113. Mercuri, N. B., and Bernardi, G. (2005) The “magic” of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 341–4
114. Godfrey, J. E., Baxevanis, A. D., and Moudrianakis, E. N. (1990) Spectropolarimetric analysis of the core histone octamer and its subunits. *Biochemistry*. **29**, 965–72
115. Collins, P., Henderson, A. H., Lang, D., and Lewis, M. J. (1988) Endothelium-derived relaxing factor and nitroprusside compared in noradrenaline- and K+-contracted rabbit and rat aortae. *J. Physiol.* **400**, 395–404
116. Parkinson Study Group SURE-PD Investigators, Schwarzschild, M. A., Ascherio,

- A., Beal, M. F., Cudkowicz, M. E., Curhan, G. C., Hare, J. M., Hooper, D. C., Kieburtz, K. D., Macklin, E. A., Oakes, D., Rudolph, A., Shoulson, I., Tennis, M. K., Espay, A. J., Gartner, M., Hung, A., Bwala, G., Lenehan, R., Encarnacion, E., Ainslie, M., Castillo, R., Togasaki, D., Barles, G., Friedman, J. H., Niles, L., Carter, J. H., Murray, M., Goetz, C. G., Jaglin, J., Ahmed, A., Russell, D. S., Cotto, C., Goudreau, J. L., Russell, D., Parashos, S. A., Ede, P., Saint-Hilaire, M. H., Thomas, C.-A., James, R., Stacy, M. A., Johnson, J., Gauger, L., Antonelle de Marcaida, J., Thurlow, S., Isaacson, S. H., Carvajal, L., Rao, J., Cook, M., Hope-Porche, C., McClurg, L., Grasso, D. L., Logan, R., Orme, C., Ross, T., Brocht, A. F. D., Constantinescu, R., Sharma, S., Venuto, C., Weber, J., and Eaton, K. (2014) Inosine to increase serum and cerebrospinal fluid urate in Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol.* **71**, 141–50
117. NIH Study of Urate Elevation in Parkinson's Disease, Phase 3
  118. Sullivan, A. M., and O'Keefe, G. W. (2016) Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease: past, present and future. *Neural Regen. Res.* **11**, 205–7
  119. Patel, N. K., and Gill, S. S. (2007) GDNF delivery for Parkinson's disease. *Acta Neurochir. Suppl.* **97**, 135–54
  120. Luz, M., Allen, P. C., Bringas, J., Boiko, C., Stockinger, D. E., Nikula, K. J., Lewis, O., Woolley, M., Fibiger, H. C., Bankiewicz, K., and Mohr, E. (2018) Intermittent convection-enhanced delivery of GDNF into rhesus monkey putamen: absence of local or cerebellar toxicity. *Arch. Toxicol.* **92**, 2353–2367
  121. Marks, W. J., Ostrem, J. L., Verhagen, L., Starr, P. A., Larson, P. S., Bakay, R. A., Taylor, R., Cahn-Weiner, D. A., Stoessl, A. J., Olanow, C. W., and Bartus, R. T. (2008) Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adenovirus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet. Neurol.* **7**, 400–8
  122. Marks, W. J., Bartus, R. T., Siffert, J., Davis, C. S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., Turner, D., Verhagen, L., Bakay, R., Watts, R., Guthrie, B., Jankovic, J., Simpson, R., Tagliati, M., Alterman, R., Stern, M., Baltuch, G., Starr, P. A., Larson, P. S., Ostrem, J. L., Nutt, J., Kieburtz, K., Kordower, J. H., and Olanow, C. W. (2010) Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet. Neurol.* **9**, 1164–1172
  123. Bartus, R. T., Baumann, T. L., Siffert, J., Herzog, C. D., Alterman, R., Boulis, N., Turner, D. A., Stacy, M., Lang, A. E., Lozano, A. M., and Olanow, C. W. (2013) Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. *Neurology.* **80**, 1698–701
  124. Warren Olanow, C., Bartus, R. T., Baumann, T. L., Factor, S., Boulis, N., Stacy, M., Turner, D. A., Marks, W., Larson, P., Starr, P. A., Jankovic, J., Simpson, R., Watts, R., Guthrie, B., Poston, K., Henderson, J. M., Stern, M., Baltuch, G., Goetz, C. G., Herzog, C., Kordower, J. H., Alterman, R., Lozano, A. M., and Lang, A. E. (2015) Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann. Neurol.* **78**, 248–57
  125. Schneeberger, A., Mandler, M., Mattner, F., and Schmidt, W. (2012) Vaccination for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **18 Suppl 1**, S11–3
  126. Schneeberger, A., Mandler, M., Mattner, F., and Schmidt, W. (2010) AFFITOME® technology in neurodegenerative diseases: the doubling advantage. *Hum. Vaccin.* **6**, 948–52
  127. George, S., and Brundin, P. (2015) Immunotherapy in Parkinson's Disease: Micromanaging Alpha-Synuclein Aggregation. *J. Parkinsons. Dis.* **5**, 413–24
  128. Krishnan, R., Tsubery, H., Proschitsky, M. Y., Asp, E., Lulu, M., Gilead, S.,

- Gartner, M., Waltho, J. P., Davis, P. J., Hounslow, A. M., Kirschner, D. A., Inouye, H., Myszk, D. G., Wright, J., Solomon, B., and Fisher, R. A. (2014) A bacteriophage capsid protein provides a general amyloid interaction motif (GAIM) that binds and remodels misfolded protein assemblies. *J. Mol. Biol.* **426**, 2500–19
129. Koike, M. A., Price, D. L., White, B. M., Rockenstein, E., Wrasidlo, W., Tsigelny, I., Meier, D., Masliah, E., and Bonhaus, D. W. (2014) The novel alpha-synuclein stabilizer NPT200-11 improves behavior, neuropathology, and Biochemistry in the murine thy1-ASYN transgenic model of Parkinson's disease. in *Society for Neuroscience*
  130. Valera, E., and Masliah, E. (2016) Therapeutic approaches in Parkinson's disease and related disorders. *J. Neurochem.* **139 Suppl**, 346–352
  131. Marquez, P. V., and Saxena, S. Making Mental Health a Global Priority. *Cerebrum*
  132. Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guillems, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., and Pirmohamed, M. (2018) Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10.1038/nrd.2018.168
  133. Ashburn, T. T., and Thor, K. B. (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 673–83
  134. Singhal, S., Mehta, J., Desikan, R., Ayers, D., Roberson, P., Eddlemon, P., Munshi, N., Anaissie, E., Wilson, C., Dhodapkar, M., Zeddis, J., and Barlogie, B. (1999) Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1565–71
  135. Klug, D. M., Gelb, M. H., and Pollastri, M. P. (2016) Repurposing strategies for tropical disease drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 2569–76
  136. Shoab, M., Kamal, M. A., and Rizvi, S. M. D. (2017) Repurposed Drugs as Potential Therapeutic Candidates for the Management of Alzheimer's Disease. *Curr. Drug Metab.* **18**, 842–852
  137. Johnston, T. H., Lacoste, A. M. B., Visanji, N. P., Lang, A. E., Fox, S. H., and Brochie, J. M. (2018) Repurposing drugs to treat l-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 10.1016/j.neuropharm.2018.05.035
  138. Athauda, D., Wyse, R., Brundin, P., and Foltynie, T. (2017) Is Exenatide a Treatment for Parkinson's Disease? *J. Parkinsons. Dis.* **7**, 451–458
  139. Athauda, D., Maclagan, K., Skene, S. S., Bajwa-Joseph, M., Letchford, D., Chowdhury, K., Hibbert, S., Budnik, N., Zampieri, L., Dickson, J., Li, Y., Aviles-Olmos, I., Warner, T. T., Limousin, P., Lees, A. J., Greig, N. H., Tebbs, S., and Foltynie, T. (2017) Exenatide once weekly versus placebo in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. **390**, 1664–1675
  140. Biglan, K. M., Oakes, D., Lang, A. E., Hauser, R. A., Hodgeman, K., Greco, B., Lowell, J., Rockhill, R., Shoulson, I., Venuto, C., Young, D., Simuni, T., and Parkinson Study Group STEADY-PD III Investigators (2017) A novel design of a Phase III trial of isradipine in early Parkinson disease (STEADY-PD III). *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **4**, 360–368
  141. Villafane, G., Thiriez, C., Audureau, E., Straczek, C., Kerschen, P., Cormier-Dequaire, F., Van Der Gucht, A., Gurruchaga, J.-M., Quéré-Carne, M., Evangelista, E., Paul, M., Defer, G., Damier, P., Remy, P., Itti, E., and Fénelon, G. (2018) High-dose transdermal nicotine in Parkinson's disease patients: a randomized, open-label, blinded-endpoint evaluation phase 2 study. *Eur. J. Neurol.* **25**, 120–127
  142. Wyse, R. K., Brundin, P., and Sherer, T. B. (2016) Nilotinib - Differentiating the



- Hope from the Hype. *J. Parkinsons. Dis.* **6**, 519–22
143. Pagan, F., Hebron, M., Valadez, E. H., Torres-Yaghi, Y., Huang, X., Mills, R. R., Wilmarth, B. M., Howard, H., Dunn, C., Carlson, A., Lawler, A., Rogers, S. L., Falconer, R. A., Ahn, J., Li, Z., and Moussa, C. (2016) Nilotinib Effects in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *J. Parkinsons. Dis.* **6**, 503–17
  144. Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H., and Taylor, D. E. (2003) Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3675–81
  145. Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000) The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell.* **103**, 1143–54
  146. Fuoco, D. (2012) Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs. *Antibiot. (Basel, Switzerland)*. **1**, 1–13
  147. Golub, L. M., McNamara, T. F., D'Angelo, G., Greenwald, R. A., and Ramamurthy, N. S. (1987) A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J. Dent. Res.* **66**, 1310–4
  148. Kraus, R. L., Pasieczny, R., Lariosa-Willingham, K., Turner, M. S., Jiang, A., and Trauger, J. W. (2005) Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J. Neurochem.* **94**, 819–27
  149. Merlini, G., Ascari, E., Amboldi, N., Bellotti, V., Arbustini, E., Perfetti, V., Ferrari, M., Zorzoli, I., Marinone, M. G., and Garini, P. (1995) Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 2959–63
  150. Forloni, G., Salmona, M., Marcon, G., and Tagliavini, F. (2009) Tetracyclines and prion infectivity. *Infect. Disord. Drug Targets.* **9**, 23–30
  151. Lazzarini, M., Martin, S., Mitkovski, M., Vozari, R. R., Stühmer, W., and Bel, E. Del (2013) Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. *Glia.* **61**, 1084–100
  152. Santa-Cecília, F. V., Socias, B., Ouidja, M. O., Sepulveda-Diaz, J. E., Acuña, L., Silva, R. L., Michel, P. P., Del-Bel, E., Cunha, T. M., and Raisman-Vozari, R. (2016) Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF-kB Signaling Pathways. *Neurotox. Res.* **29**, 447–59
  153. Manthripragada, A. D., Schernhammer, E. S., Qiu, J., Friis, S., Wermuth, L., Olsen, J. H., and Ritz, B. (2011) Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology.* **36**, 155–61
  154. Costa, R., Speretta, E., Crowther, D. C., and Cardoso, I. (2011) Testing the therapeutic potential of doxycycline in a *Drosophila melanogaster* model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 41647–55
  155. Giorgetti, S., Raimondi, S., Pagano, K., Relini, A., Bucciantini, M., Corazza, A., Fogolari, F., Codutti, L., Salmona, M., Mangione, P., Colombo, L., De Luigi, A., Porcari, R., Gliozzi, A., Stefani, M., Esposito, G., Bellotti, V., and Stoppini, M. (2011) Effect of tetracyclines on the dynamics of formation and destructure of beta2-microglobulin amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.* **286**, 2121–31
  156. Hoyer, W., Antony, T., Cherny, D., Heim, G., Jovin, T. M., and Subramaniam, V. (2002) Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J. Mol. Biol.* **322**, 383–93
  157. Weber, K., and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight

- determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406–12
158. Biancalana, M., and Koide, S. (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 1405–12
  159. Kelényi, G. (1967) On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J. Histochem. Cytochem.* **15**, 172–80
  160. Stsiapura, V. I., Maskevich, A. A., Kuzmitsky, V. A., Turoverov, K. K., and Kuznetsova, I. M. (2007) Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state. *J. Phys. Chem. A.* **111**, 4829–35
  161. Naiki, H., Higuchi, K., Matsushima, K., Shimada, A., Chen, W. H., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1990) Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T. *Lab. Invest.* **62**, 768–73
  162. LeVine, H. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**, 404–10
  163. Celej, M. S., Jares-Erijman, E. A., and Jovin, T. M. (2008) Fluorescent N-arylaminoanthracene sulfonate probes for amyloid aggregation of alpha-synuclein. *Biophys. J.* **94**, 4867–79
  164. Kendall, D. A., and MacDonald, R. C. (1982) A fluorescence assay to monitor vesicle fusion and lysis. *J. Biol. Chem.* **257**, 13892–5
  165. Council., N. R., Animals., C. for the U. of the G. for the C., Laboratory, U. of, and Research., I. for L. A. (2011) *Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. Guide for the care and use of laboratory animals*, 10.1163/1573-3912\_islam\_DUM\_3825
  166. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509
  167. Ames, B. N. (1966) [10] Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases, pp. 115–118, 10.1016/0076-6879(66)08014-5
  168. Arrondo, J. L., Muga, A., Castresana, J., and Goñi, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23–56
  169. Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 95–120
  170. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503
  171. Lichtman, J. W., and Conchello, J.-A. (2005) Fluorescence microscopy. *Nat. Methods.* **2**, 910–9
  172. Boshuizen, R. S., Langeveld, J. P. M., Salmons, M., Williams, A., Meloen, R. H., and Langedijk, J. P. M. (2004) An in vitro screening assay based on synthetic prion protein peptides for identification of fibril-interfering compounds. *Anal. Biochem.* **333**, 372–80
  173. Sorribas de Lozano, V., Morales, A., and Yañez, M. J. (2014) *Principios y práctica de la Microscopía Electrónica*, 1ra. Edici, Bahía Blanca
  174. Rousseau, E., Michel, P. P., and Hirsch, E. C. (2013) The iron-binding protein lactoferrin protects vulnerable dopamine neurons from degeneration by preserving mitochondrial calcium homeostasis. *Mol. Pharmacol.* **84**, 888–98
  175. Sepulveda-Diaz, J. E., Ouidja, M. O., Socias, S. B., Hamadat, S., Guerreiro, S.,

- Raisman-Vozari, R., and Michel, P. P. (2016) A simplified approach for efficient isolation of functional microglial cells: Application for modeling neuroinflammatory responses in vitro. *Glia*. **64**, 1912–24
176. Kaufman, L. M., and Barrett, J. N. (1983) Serum factor supporting long-term survival of rat central neurons in culture. *Science*. **220**, 1394–6
  177. LeVine, H. (1999) Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **309**, 274–84
  178. Uversky, V. N., Li, J., and Fink, A. L. (2001) Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.* **276**, 44284–96
  179. Deckert, A., Waudby, C. A., Wlodarski, T., Wentink, A. S., Wang, X., Kirkpatrick, J. P., Paton, J. F. S., Camilloni, C., Kukic, P., Dobson, C. M., Vendruscolo, M., Cabrita, L. D., and Christodoulou, J. (2016) Structural characterization of the interaction of  $\alpha$ -synuclein nascent chains with the ribosomal surface and trigger factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 5012–7
  180. Carlomagno, T. (2005) Ligand-target interactions: what can we learn from NMR? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 245–66
  181. Valiente-Gabioud, A. A., Miotto, M. C., Chesta, M. E., Lombardo, V., Binolfi, A., and Fernández, C. O. (2016) Phthalocyanines as Molecular Scaffolds to Block Disease-Associated Protein Aggregation. *Acc. Chem. Res.* **49**, 801–8
  182. Sarroukh, R., Goormaghtigh, E., Ruysschaert, J.-M., and Raussens, V. (2013) ATR-FTIR: a “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1828**, 2328–38
  183. Hong, D.-P., Fink, A. L., and Uversky, V. N. (2008) Structural characteristics of alpha-synuclein oligomers stabilized by the flavonoid baicalein. *J. Mol. Biol.* **383**, 214–23
  184. Byler, D. M., and Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*. **25**, 469–87
  185. Bañuelos, S., and Muga, A. (1995) Binding of molten globule-like conformations to lipid bilayers. Structure of native and partially folded alpha-lactalbumin bound to model membranes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29910–5
  186. Krimm, S., and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* **38**, 181–364
  187. Bolognesi, B., Kumita, J. R., Barros, T. P., Esbjorner, E. K., Luheshi, L. M., Crowther, D. C., Wilson, M. R., Dobson, C. M., Favrin, G., and Yerbury, J. J. (2010) ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chem. Biol.* **5**, 735–40
  188. Backman, T. W. H., Cao, Y., and Girke, T. (2011) ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. *Nucleic Acids Res.* **39**, W486–91
  189. Griffin, M. O., Ceballos, G., and Villarreal, F. J. (2011) Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: possible mechanisms of action. *Pharmacol. Res.* **63**, 102–7
  190. Patel, R. N., Attur, M. G., Dave, M. N., Patel, I. V., Stuchin, S. A., Abramson, S. B., and Amin, A. R. (1999) A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E2 production. *J. Immunol.* **163**, 3459–67
  191. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., and Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and



- permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26
192. Hansch, C., Rockwell, S. D., Jow, P. Y. C., Leo, A., and Steller, E. E. (1977) Substituent constants for correlation analysis. *J. Med. Chem.* **20**, 304–306
  193. Rudek, M. A., New, P., Mikkelsen, T., Phuphanich, S., Alavi, J. B., Nabors, L. B., Piantadosi, S., Fisher, J. D., and Grossman, S. A. (2011) Phase I and pharmacokinetic study of COL-3 in patients with recurrent high-grade gliomas. *J. Neurooncol.* **105**, 375–81
  194. Rudek, M. A., Figg, W. D., Dyer, V., Dahut, W., Turner, M. L., Steinberg, S. M., Liewehr, D. J., Kohler, D. R., Pluda, J. M., and Reed, E. (2001) Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **19**, 584–92
  195. Tolomeo, M., Grimaudo, S., Milano, S., La Rosa, M., Ferlazzo, V., Di Bella, G., Barbera, C., Simoni, D., D'Agostino, P., and Cillari, E. (2001) Effects of chemically modified tetracyclines (CMTs) in sensitive, multidrug resistant and apoptosis resistant leukaemia cell lines. *Br. J. Pharmacol.* **133**, 306–14
  196. Lokeshwar, B. L., Escatel, E., and Zhu, B. (2001) Cytotoxic Activity and Inhibition of Tumor Cell Invasion by Derivatives of a Chemically Modified Tetracycline CMT-3 (COL-3). **3**, 271–279
  197. Dezube, B. J., Krown, S. E., Lee, J. Y., Bauer, K. S., and Aboulafia, D. M. (2006) Randomized phase II trial of matrix metalloproteinase inhibitor COL-3 in AIDS-related Kaposi's sarcoma: an AIDS Malignancy Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1389–94
  198. Edan, R. A., Luqmani, Y. A., and Masocha, W. (2013) COL-3, a chemically modified tetracycline, inhibits lipopolysaccharide-induced microglia activation and cytokine expression in the brain. *PLoS One.* **8**, e57827
  199. González-Lizárraga, F., Socías, S. B., Ávila, C. L., Torres-Bugeau, C. M., Barbosa, L. R. S., Binolfi, A., Sepúlveda-Díaz, J. E., Del-Bel, E., Fernandez, C. O., Papy-Garcia, D., Itri, R., Raisman-Vozari, R., and Chehín, R. N. (2017) Repurposing doxycycline for synucleinopathies: remodelling of  $\alpha$ -synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species. *Sci. Rep.* **7**, 41755
  200. Dos-Santos-Pereira, M., Acuña, L., Hamadat, S., Rocca, J., González-Lizárraga, F., Chehín, R., Sepulveda-Diaz, J., Del-Bel, E., Raisman-Vozari, R., and Michel, P. P. (2018) Microglial glutamate release evoked by  $\alpha$ -synuclein aggregates is prevented by dopamine. *Glia.* **66**, 2353–2365
  201. Bussi, C., Peralta Ramos, J. M., Arroyo, D. S., Gaviglio, E. A., Gallea, J. I., Wang, J. M., Celej, M. S., and Iribarren, P. (2017) Autophagy down regulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell death. *Sci. Rep.* **7**, 43153
  202. Coyle, J. T., and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* **262**, 689–95
  203. Murugan, M., Ling, E.-A., and Kaur, C. (2013) Glutamate receptors in microglia. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **12**, 773–84
  204. Dorsey, E. R., and Bloem, B. R. (2018) The Parkinson Pandemic-A Call to Action. *JAMA Neurol.* **75**, 9–10
  205. Domercq, M., and Matute, C. (2004) Neuroprotection by tetracyclines. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 609–12
  206. Clark, W. M., Calcagno, F. A., Gabler, W. L., Smith, J. R., and Coull, B. M. (1994) Reduction of central nervous system reperfusion injury in rabbits using doxycycline treatment. *Stroke.* **25**, 1411–5; discussion 1416

207. Antonio, R. C., Ceron, C. S., Rizzi, E., Coelho, E. B., Tanus-Santos, J. E., and Gerlach, R. F. (2014) Antioxidant effect of doxycycline decreases MMP activity and blood pressure in SHR. *Mol. Cell. Biochem.* **386**, 99–105
208. Di Caprio, R., Lembo, S., Di Costanzo, L., Balato, A., and Monfrecola, G. (2015) Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an in vitro study. *Mediators Inflamm.* **2015**, 329418
209. Gordon, P. H., Moore, D. H., Gelinas, D. F., Qualls, C., Meister, M. E., Werner, J., Mendoza, M., Mass, J., Kushner, G., and Miller, R. G. (2004) Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* **62**, 1845–7
210. Metz, L. M., Zhang, Y., Yeung, M., Patry, D. G., Bell, R. B., Stoian, C. A., Yong, V. W., Patten, S. B., Duquette, P., Antel, J. P., and Mitchell, J. R. (2004) Minocycline reduces gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **55**, 756
211. Lorenzen, N., Nielsen, S. B., Yoshimura, Y., Vad, B. S., Andersen, C. B., Betzer, C., Kaspersen, J. D., Christiansen, G., Pedersen, J. S., Jensen, P. H., Mulder, F. A. A., and Otzen, D. E. (2014) How epigallocatechin gallate can inhibit  $\alpha$ -synuclein oligomer toxicity in vitro. *J. Biol. Chem.* **289**, 21299–310
212. Lendel, C., Bertoni, C. W., Cremades, N., Waudby, C. A., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., Schenk, D., Christodoulou, J., and Toth, G. (2009) On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of alpha-synuclein with Congo red and lacmoid. *Biochemistry.* **48**, 8322–34
213. Chen, Y.-J., Wu, C.-S., Shieh, J.-J., Wu, J.-H., Chen, H.-Y., Chung, T.-W., Chen, Y.-K., and Lin, C.-C. (2013) Baicalein Triggers Mitochondria-Mediated Apoptosis and Enhances the Antileukemic Effect of Vincristine in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia CCRF-CEM Cells. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, 124747
214. Ardah, M. T., Paleologou, K. E., Lv, G., Abul Khair, S. B., Kazim, A. S., Minhas, S. T., Al-Tel, T. H., Al-Hayani, A. A., Haque, M. E., Eliezer, D., and El-Agnaf, O. M. A. (2014) Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of  $\alpha$ -synuclein fibril formation and toxicity. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 197
215. Singh, P. K., Kotia, V., Ghosh, D., Mohite, G. M., Kumar, A., and Maji, S. K. (2013) Curcumin modulates  $\alpha$ -synuclein aggregation and toxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 393–407
216. Jha, N. N., Ghosh, D., Das, S., Anoop, A., Jacob, R. S., Singh, P. K., Ayyagari, N., Namboothiri, I. N. N., and Maji, S. K. (2016) Effect of curcumin analogs on  $\alpha$ -synuclein aggregation and cytotoxicity. *Sci. Rep.* **6**, 28511
217. Burgos-Morón, E., Calderón-Montaña, J. M., Salvador, J., Robles, A., and López-Lázaro, M. (2010) The dark side of curcumin. *Int. J. cancer.* **126**, 1771–5
218. Valentín, S., Morales, A., Sánchez, J. L., and Rivera, A. (2009) Safety and efficacy of doxycycline in the treatment of rosacea. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2**, 129–40
219. Egeberg, A., Hansen, P. R., Gislason, G. H., and Thyssen, J. P. (2016) Exploring the Association Between Rosacea and Parkinson Disease: A Danish Nationwide Cohort Study. *JAMA Neurol.* **73**, 529–34
220. Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M.-Y. (2012) Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science.* **338**, 949–53
221. Luk, K. C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J. R., Brunden, K. R.,

- 
- Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M.-Y. (2009) Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20051–6
222. Bussi, C., Peralta Ramos, J. M., Arroyo, D. S., Gallea, J. I., Ronchi, P., Kolovou, A., Wang, J. M., Florey, O., Celej, M. S., Schwab, Y., Ktistakis, N. T., and Iribarren, P. (2018) Alpha-synuclein fibrils recruit TBK1 and OPTN to lysosomal damage sites and induce autophagy in microglial cells. *J. Cell Sci.* 10.1242/jcs.226241
223. Luo, J., Otero, J. M., Yu, C.-H., Wärmländer, S. K. T. S., Gräslund, A., Overhand, M., and Abrahams, J. P. (2013) Inhibiting and reversing amyloid- $\beta$  peptide (1-40) fibril formation with gramicidin S and engineered analogues. *Chemistry*. **19**, 17338–48
224. Li, J., Zhu, M., Rajamani, S., Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2004) Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem. Biol.* **11**, 1513–21
225. Yang, J. E., Rhoo, K. Y., Lee, S., Lee, J. T., Park, J. H., Bhak, G., and Paik, S. R. (2017) EGCG-mediated Protection of the Membrane Disruption and Cytotoxicity Caused by the “Active Oligomer” of  $\alpha$ -Synuclein. *Sci. Rep.* **7**, 17945